

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

João Paulo de Lacerda Roberto

Caracterização molecular do *Mycobacterium avium* subspécie *paratuberculosis*
em leite de cabra produzidos na região semiárida da Paraíba do Nordeste
Brasileiro.

Patos/PB
2021

João Paulo de Lacerda Roberto

Caracterização molecular do *Mycobacterium avium* subspecie *paratuberculosis*
em leite de cabra produzidos na região semiárida da Paraíba do Nordeste
Brasileiro.

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Saúde
Animal, da Universidade Federal de
Campina Grande, como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência e Saúde Animal.

Professor Titular Dr. Clebert José Alves
Orientador

Patos/PB
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

R642c Roberto, João Paulo de Lacerda
Caracterização molecular do *Mycobacterium avium* subspecie *paratuberculosis* em leite de cabra produzidos na região semiárida da Paraíba do Nordeste Brasileiro / João Paulo de Lacerda Roberto. – Patos, 2021.
66f.: il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Saúde Animal) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Clebert José Alves

Referências.

1. Cabra. 2. Leite. 3. MAP. 4. Unidades de Proteção. 5. Revisão Sistemática. 6. Semiárido. I. Título.

CDU 619

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
POS-GRADUACAO EM CIENCIA E SAUDE ANIMAL
Rua Aprígio Veloso, 882, - Bairro Universitário, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

FOLHA DE ASSINATURA PARA TESES E DISSERTAÇÕES

JOÃO PAULO DE LACERDA ROBERTO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIE
PARATUBERCULOSIS EM LEITE DE CABRA PRODUZIDOS NA REGIÃO
SEMIÁRIDA DO NORDESTE BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Programa de
PósGraduação em Ciência e Saúde
Animal como pré-requisito para obtenção
do título de Doutor em Ciência e Saúde
Animal.

Aprovada em: 25/02/2021

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Clebert José Alves (Orientador - PPGCSA/UFCG)
Prof. Dr. Sergio Santos de Azevedo (Examinador Interno - PPGCSA/UFCG)
Prof. Dr. Albério Antônio de Barros Gomes (Examinador Externo - UFCG)
Prof. Dr. Francisco Selmo Fernandes Alves (Examinador Externo - EMBRAPA)
Prof. Dr. Theonys Diógenes Freitas (Examinador Externo - UNIFIP)

Documento assinado eletronicamente por SERGIO SANTOS DE AZEVEDO,
COORDENADOR (A), em 25/02/2021, às 12:27, conforme horário oficial de Brasília, com
fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).

Documento assinado eletronicamente por ALBERIO ANTONIO DE BARROS GOMES,
PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR, em 25/02/2021, às 12:27, conforme
horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de
outubro de 2018](#).

Documento assinado eletronicamente por CLEBERT JOSE ALVES, PROFESSOR(A) DO
MAGISTERIO SUPERIOR, em 25/02/2021, às 12:27, conforme horário oficial de Brasília,
com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).

Assinatura

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
<https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **1299543** e o código
CRC 22CBAF31.

Dedico
A medica veterinária, Francisca Ilva de Lacerda

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pela salvação e pela capacitação que me deu durante todo esse percurso “Yeshua”.

Aos meus pais Francisca Ilva de Lacerda e Nivaldo Gonçalves, por todo o amor e carinho. Em especial a minha mãe que diante das dificuldades lutou dia após dia para dar o exemplo de como lutar pelos seus objetivos.

Aos meus irmãos, Hugo, Keylla e Nivaldinho. Deus foi muito generoso em ter colocado vocês em minha vida, somos exemplo de amor e união.

À minha esposa Danny, companheira no amor, e em todos os desafios que a vida nos impôs. Obrigado pelo incentivo em estudar cada vez mais desde o meu quinto período da graduação.

Aos meus tesouros Ana Clara, Nathally e Andre, foi por vocês e para vocês que eu cheguei até aqui. Daqui para frente tudo ficará melhor.

Aos meus sogros (Leninha e Deda) e cunhados por todo o companheirismo, momentos de auxílio e diversão.

A todos os amigos e colegas pertencentes ao Grupo de Pesquisa Doenças Transmissíveis do CSTR/UFCG pelo apoio e aprendizado compartilhado durante todo o período de convivência desde a sala de aula até o Laboratório.

Aos colegas que se transformaram em irmãos, os Azilados da Veterinária.

Ao meu orientador, Prof. Titular Dr. Clebert José Alves, por todo ensinamento e crédito depositado desde o dia em que eu pedi para ser meu orientador. Obrigado por ser um verdadeiro pai e conselheiro em vários momentos ao longo desses quase 10 anos.

Aos colegas Clécio, Rafael, Nathanael e Luana, por compartilhar o aprendizado e pelos direcionamentos no desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores Silvano (Compadre), Sérgio e Carol e Albério por todo suporte e ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal (PPGCSA) por todo apoio para com todos os discentes.

A todos os proprietários que consentiram as coletas de amostras dos seus animais, pela contribuição primordial ao desenvolvimento desse trabalho.

A todos os meus sobrinhos e sobrinhas que levo no peito como se filhos fossem.

RESUMO

Essa tese é composta por três artigos. No Capítulo I foi realizada uma revisão sistemática e meta-análise para avaliar a detecção de anticorpos e análise molecular para *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) em leite de cabra. Foram empregados como parâmetros de busca: “*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* AND (goat OR small ruminant) AND (milk OR pasteurized milk)”. Obedecendo rigorosamente critérios preestabelecidos, 437 artigos foram selecionados nas respectivas bases eletrônicas de conteúdo científico: ScienceDirect (285), PubMed (68), Web of Science (60) e Scopus (24), dos quais, nove trabalhos foram eleitos à construção da revisão sistemática e meta-análise. A prevalência de MAP no leite variou entre 1.1 e 67.7% no Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), e 1.94 a 37.74% na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A meta-análise indicou uma prevalência geral combinada de 8.24%, porém com alta heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 98.7\%$). Constatou-se a presença significativa de MAP no leite de cabra, implicando na necessidade de vigilância do agente, de forma a preservar a saúde pública e do rebanho. O Capítulo II teve como objetivo confirmar a presença e realizar a caracterização molecular do MAP no leite de cabras destinados ao processamento em usinas de beneficiamento da região semiárida do Nordeste brasileiro. Foram analisadas amostras de 179 unidades de produção, cinco tanques coletivos e quatro amostras do leite de cabra pasteurizado. A Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) foi usada como teste molecular. O material genético (DNA) de MAP foi encontrado na amostra de leite de cabra de uma unidade de produção (0,56%; 1/179). A partir dessa amostra positiva, onze cabras em lactação foram identificadas na propriedade de origem e nove delas (81,82%; 9/11) apresentaram DNA de MAP em amostras de leite. No Capítulo III foram relatados os achados clínicos, histopatológicos e moleculares do (MAP) em cabras leiteiras do semiárido nordestino, Brasil. A partir de uma amostra positiva composta pelo pool do leite de cabras de uma unidade de produção localizada no município de Monteiro, estado da Paraíba, Brasil. No teste individual de 11 cabras em lactação, foi encontrando 9 amostras positivas, conforme descrito em estudo prévio. Duas cabras (uma positiva e outra negativa na primeira qPCR para MAP) foram adquiridas e eutanasiadas. Os animais 1 e 2 tiveram o leite e porções do duodeno, íleo, colón e linfonodos mesentéricos positivos para qPCR de MAP. O animal 1 ainda teve detectado o DNA de MAP em porção do jejuno e ceco, já o animal 2 foi positivo na porção da válvula ileocecal. Não foi detectado MAP no sangue e fezes de ambos os animais. O diagnóstico da infecção para o MAP foi confirmado pela associação dos achados

clínicos, histopatológico e qPCR. Os genes das amostras positivas foram sequenciados e demonstraram 99% de similaridade com MAP. Constatou-se pela primeira vez a presença do *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* no leite e tecidos de cabras na região semiárida, o que revela potencial risco biológico ao homem e implica na necessidade de vigilância ativa do agente.

Palavras-chave: Cabras, leite, MAP, unidades de produção, revisão sistemática, semiárido.

ABSTRACT

This thesis consists of three articles. In Chapter I it was carried out through a systematic review and meta-analysis to evaluate the detection of antibodies and molecular analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in goat's milk. The following search parameters were used: “*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* AND (goat OR small ruminant) AND (milk OR pasteurized milk)”. Strictly obeying pre-established criteria, 437 articles were selected from the respective electronic bases of scientific content: ScienceDirect (285), PubMed (68), Web of Science (60) and Scopus (24), of which, nine papers were elected to the construction of the review systematic and meta-analysis. The prevalence of MAP in milk ranged from 1.1 to 67.7% in the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), and from 1.94 to 37.74% in the Polymerase Chain Reaction (PCR). The meta-analysis indicated a combined overall prevalence of 8.24%, but with high heterogeneity between studies ($I^2 = 98.7\%$). A significant presence of MAP was found in goat's milk, implying the need for surveillance of the agent, in order to preserve public and herd health. Chapter II aimed to confirm the presence and carry out the molecular characterization of MAP in the milk of goats destined for processing in processing plants in the semi-arid region of Northeast Brazil. Samples from 179 production units, five collective tanks and four samples of pasteurized goat milk were analyzed. The real time Polymerase Chain Reaction (qPCR) was used as a molecular test. MAP genetic material (DNA) was found in the goat's milk sample from a production unit (0.56%; 1/179). From this positive sample, eleven lactating goats were identified on the farm of origin and nine of them (81.82%; 9/11) presented MAP DNA in milk samples. In Chapter III, the clinical, histopathological and molecular findings of (MAP) were reported in dairy goats from the Northeastern semiarid, Brazil. From a positive sample composed of the goat milk pool of a production unit located in the municipality of Monteiro, state of Paraíba, Brazil. In the individual test of 11 lactating goats, 9 positive samples were found, as described in a previous study. Two goats (one

positive and one negative in the first MAP qPCR) were acquired and euthanized. Animals 1 and 2 had milk and portions of the duodenum, ileum, colon and mesenteric lymph nodes positive for MAP qPCR. Animal 1 still had MAP DNA detected in a portion of the jejunum and cecum, while animal 2 was positive in the ileocecal valve portion. MAP was not detected in the blood and feces of both animals. The diagnosis of infection for MAP was confirmed by the association of clinical, histopathological and qPCR findings. The genes of the positive samples were sequenced and demonstrated 99% similarity with MAP. The presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* was found for the first time in milk and goat tissues in the semiarid region, which reveals a potential biological risk to man and implies the need for active surveillance of the agent.

Keywords: Goats, milk, MAP, production units, systematic review, semiarid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I	Página
Figura 1. Fluxograma do processo de busca, seleção e conclusão de estudos na revisão sistemática e meta-análise.....	11
Figura 2. Avaliação combinada dos 09 estudos sobre prevalência de <i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>paratuberculosis</i> em leite de cabra.....	11
Figura 3. Apresentação da distribuição assimétrica no gráfico de funil dos estudos sobre prevalência de <i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>paratuberculosis</i> no leite de cabra... ..	11
CAPÍTULO II	
Figura 1. Distribuição geográfica dos municípios com usinas de beneficiamento de leite de cabra onde foram coletadas amostras de tanques individuais das unidades de produção para detecção molecular de MAP no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.	11
Figura 2. Árvore filogenética do <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) estabelecidas pelo método de máxima verossimilhança onde sequência mostrou identidade de aproximadamente 99% com KJ173784 no BLAST, oriunda de uma Unidade de Produção da região intermediária de Campina Grande, Paraíba, Brasil.	11
CAPÍTULO III	
Figura 1. Distribuição geográfica dos municípios com usinas de beneficiamento de leite de cabra onde foram coletadas amostras de tanques individuais.	
Figura 2. Caprino apresentando baixo escore corporal, pelos opacos e eriçados (Animal 1).	
Figura 3. Achados macroscópicos com enrugamento moderado e difuso da mucosa do íleo e ceco, mucosa discretamente pálida e aumento do linfonodo mesentérico (Animal 1).	
Figura 4. Achados macroscópicos apresentando espessamento, enrugamento e avermelhamento moderado e difuso da mucosa do jejuno (Cabra 2).	
Figura 5. Microscopia do ceco com aumento de 10x demonstrando moderado a acentuado infiltrado inflamatório constituído de eosinófilos, linfócitos e plasmócitos na lâmina própria da mucosa (Animal 1).....	11

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Página

Tabela 1. Aspectos gerais da prevalência de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* em leite de cabra nos 09 estudos aptos à revisão sistemática e meta-análise.....13

Tabela 2. Resultado sumarizado da meta-análise sobre prevalência de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* em leite de cabra.13

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE TABELAS	11
INTRODUÇÃO GERAL	15
REFERÊNCIAS GERAIS	18
CAPÍTULO I. Detecção de anticorpos e análise molecular para <i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>paratuberculosis</i> (MAP) em leite de cabra: revisão sistemática e meta-análise.	20
Resumo	21
Abstract.....	21
Introdução.....	22
Material e métodos	24
Estratégia de pesquisa e elegibilidade dos artigos.....	24
Critérios de inclusão e exclusão.	24
Extração e análise dos dados	25
Resultados.....	25
Discussão.....	26
Referências	29
CAPITULO II: Caracterização molecular do <i>Mycobacterium avium</i> subspécies <i>paratuberculosis</i> (MAP) em leite de cabras destinado ao processamento em usinas de beneficiamento da região semiárida do Nordeste Brasileiro.	38
Resumo	39
Abstract:	39
Introdução.....	40
Material e métodos	41
Área do estudo e seleção dos municípios	41
Delineamento Amostral.....	41
Atividades de campo	42
Extração do material genético	42
Resultados.....	42
Discussão.....	43
Conclusão	44
Referências	45

CAPITULO III: Achados clínicos, histopatológicos e moleculares do <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> (MAP) em cabras leiteiras em condições semiáridas ..	49
Introdução	51
Material e métodos	52
Coleta de material biológico e análise histopatológica	53
Resultados.....	54
Discussão	55
Conclusão	58
Referências	58
CONCLUSÃO GERAL	66

INTRODUÇÃO GERAL

A caprinocultura uma das atividades econômicas mais importantes desenvolvidas no Brasil é vista como uma alternativa economicamente viável para produtores rurais em diversas regiões do país, especialmente na região Nordeste, por caracterizar um papel social para os agricultores rurais e ajudar na permanência do homem no campo (VASCONCELOS, 2010).

O crescimento dessa atividade no Brasil vem sendo consolidada juntamente aos avanços de gestão e tecnologia, principalmente pela adaptabilidade na região semiárida destas espécies e suas condições climáticas favoráveis. O rebanho caprino no Brasil ultrapassou oito milhões e seiscentas mil cabeças, e uma grande parcela situa-se na região Nordeste, principalmente nos Estados da Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí e Paraíba. Relatado a única região onde os rebanhos de caprinos e de ovinos cresceram ao mesmo tempo, entre os anos de 2006 e 2017. É o que descreve o mais recente Censo Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), divulgado que o rebanho de caprinos teve aumento de 93% (8,6 milhões de cabeças) do efetivo caprino do país. Já a Paraíba é o estado brasileiro que mais produz leite de cabra, com total 5.627.000 litros/ano, impulsionada pela implementação de programas de incentivo à caprinocultura leiteira (IBGE, 2019).

Alguns fatores impedem o desenvolvimento da caprinocultura leiteira no semiárido brasileiro, estes estão associados a dificuldades de manejo como assistência técnica especializada e sanitárias como insumos que auxiliem a higienização das tetas das cabras, isso causa prejuízos econômicos e aumentam o risco de transmissão de zoonoses, como, por exemplo, a ocorrência de paratuberculose em rebanhos da região (FREITAS et al., 2015).

Essa patologia compreende uma infecção contagiosa incurável, com distribuição mundial e acometimento abrangente de diversas espécies de animais, incluindo ruminantes domésticos (principalmente bovinos, caprinos e ovinos), caracterizada por uma inflamação severa crônica na parede do intestino (enterite granulomatosa crônica). A paratuberculose também é conhecida como doença de Johne e apresenta na sua sintomatologia uma enterite com linfadenite granulomatosa crônica resultando em diarreia, perda progressiva de peso, desnutrição, diminuição da produção de leite e óbito (Lombard, 2011; World Organization for Animal Health - OIE, 2018).

O agente etiológico é o *Mycobacterium avium* subespécie paratuberculosis (MAP) que é classificado como um membro do Complexo *Mycobacterium avim-intracellulare* (MAC). MAP é o agente responsável pela paratuberculose, são bacilos álcool-ácido resistentes

(BAAR), Gram positivos, imóveis e aeróbicos, semelhante a outras micobactérias que constituem a parede celular espessa e composta por lipídeos, o que determina sua propriedade álcool-ácido resistente. Considerada resistente a situações extremas de frio, calor e pH, desenvolvendo a capacidade de sobreviver por longos períodos no solo, fezes e água além de possuir crescimento muito lento em meio de cultura, sendo um microrganismo bastante fastidioso (TIMMS et al., 2011; RATHNAIAH et al., 2017).

A Paratuberculose pode ser transmitida pela ingestão de alimento ou água contaminada, através da eliminação da bactéria nas fezes e no leite de cabra, possibilitando o contágio conseqüentemente durante a amamentação de animais jovens. Sabe-se que 10% dos animais na fase subclínica eliminam o bacilo no leite. Podendo este resistir a pasteurização e ser uma importante via de transmissão para as populações humanas (CHAMBERLIN et al., 2001; SINGH et al. 2019).

A doença de Johne é uma enfermidade de múltiplas espécies, sendo um problema para a pecuária e, possivelmente, à saúde humana, devendo, portanto, sua ocorrência ser notificada aos órgãos estaduais de agricultura. Destacando os prejuízos econômicos causados em rebanhos é considerada uma potencial ameaça à indústria animal devido à sua natureza insidiosa. Sua relevância no aprofundamento de testes de diagnóstico, elaboração de estratégias eficientes na prevenção, controle e erradicação é necessário para garantir a sanidade aos animais de produção e segurança alimentar ao homem (OIE, 2018).

Em pequenos ruminantes a dificuldade em se diagnosticar a doença através dos aspectos clínicos apresenta um grande desafio, pois a sintomatologia quando presente é inespecífica. Para o diagnóstico da infecção no leite de cabra a cultura do MAP através do isolamento e a identificação do MAP é mais comum para confirmação de casos clínicos devido ao crescimento lento. A técnica direta PCR, expressa resultados rápidos, capazes de detectar infecções assintomáticas através de amostras de leite de cabras (Sukumar et al., 2014), viabilizando a tipificação do agente etiológico, apesar de seu custo elevado para uso em sistemas de vigilância que necessite de amostras individuais nos animais do rebanho. Testes sorológicos como o ELISA podem ser realizados porém a coleta de amostras de sangue causa desconforto para os animais, tornando a análise de leite mais convenientes (SOUZA et al., 2016; ROBERTO et al., 2021).

A infecção apresenta um longo período de incubação e os animais infectados podem permanecer assintomáticos durante meses ou até mesmo anos, assim desenvolvendo várias formas clínicas e subclínicas para cada animal portador, contudo devido a sua progressividade e conseqüentemente morte, o objetivo do estudo foi relatar e confirmar a presença de

paratuberculose; realizar a caracterização molecular do MAP no leite de cabras destinados ao processamento em usinas de beneficiamento da região semiárida do Nordeste brasileiro.

A tese é composta por três Capítulos elaborados por artigos originais. O Capítulo I teve como objetivo realizar um levantamento da literatura disponível em meio eletrônico para revisão de forma sistemática, seguida de meta-análise dos resultados encontrados sobre prevalência e testes de diagnóstico adotados na detecção de anticorpos e DNA de MAP no leite. Com o título “Antibody detection and molecular analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in goat milk: systematic review and meta-analysis”, publicado no Periódico *Research in Veterinary Science* – Qualis A1. O segundo Capítulo foi composto pelo artigo intitulado “Caracterização molecular do *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) em leite de cabras destinado ao processamento em usinas de beneficiamento da região semiárida do Nordeste brasileiro.”, e será submetido ao Periódico *Research in Veterinary Science* – Qualis A1. E o terceiro Capítulo foi constituído pelo artigo “Achados clínicos, histopatológicos e moleculares do *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) em cabras leiteiras do semiárido nordestino, Brasil.”, a ser publicado no Periódico *Research in Veterinary Science* – Qualis A1.

REFERÊNCIAS GERAIS

Chamberlin, W.; Graham, D.Y.; Hulten, K.; El-Zimaity, H.M. T.; Schwartz, M. R.; Naser, S.; Shafran, I.; El-ZaatarI, F.A.K. **Review article: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease.** Aliment.Pharmacol.Ther. 15(3):337-346. 2001.

Freitas, T.D.; Silva, M. L.C.R.; Garino, F.J.; Azevedo, S.A.; Santos, C.S.A.B.; Clementino, I.J.; Riet-correa, F. A.; Alves, C.J. **Epidemiological characterization and risk factors associated with Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis infection in dairy goats in the Brazilian semiarid.**Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 36, n. 1, p. 267-276, jan./fev. 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário: resultados definitivos 2017. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html. Acesso em: 8 dez 2020.

Lombard, J.E., 2011. Epidemiology and economics of paratuberculosis. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 27, 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.012>

OIE, 2018. World Organization for Animal Health. Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.15_PARATB.pdf. Acesso 16 Fev 2020.

Rathnaiah, G., Zinniel, D.K., Bannantine, J.P., Stabel, J.P., Gröhn, Y.T., Collins, M., Barletta, R.G., 2017. Pathogenesis, Molecular Genetics, and Genomics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the Etiologic Agent of Johne's Disease. Frontiers in Veterinary Science, 4, 187. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00187>

Roberto, J.P.L., Limeira, C.L., Barnabé, N.N.C., Soares, R.R., Silva, M.L.C.R., Gomes, A.A.B., Higino, S.S.S., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2021. Antibody detection and molecular analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in goat milk:

Systematic review and meta-analysis. *Research in Veterinary Science*, 135: 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.01.004>.

Singh, Manju; Gupta, Saurabh; Chaubey, Kundan; Singh, Shoor; Sohal, Jagdip. 2019. Profiling of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in the milk of lactating goats using antigen-antibody based assays. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 64. 10.1016/j.cimid.2019.02.006.

Souza, M.C.C., Lima, M.C., Braga, I.F.E., Schwarz, D.G.G., Rodrigues, A.N.S., Sales, E.B., Junior, A.N.F., Moreira, A.M.S., 2016. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) isolated from dairy goats in Brazil. *Small Ruminant Research*, 140, 18-21. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.009>

Timms, V.J.; Gehringer, M.M.; Mitchell, H.M.; Daskalopoulos, G.; Neilan, B.A. How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? *Journal of Microbiological Methods*, v.85, p.1-8, 2011.

Vasconcelos, V.R., Vieira, L.S. 2010. **A evolução da caprino-ovinocultura brasileira.** <http://www.cnpc.embrapa.br/artigo8.htm>. Acessado em: 10/08/2015.

CAPÍTULO I. Detecção de anticorpos e análise molecular para *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) em leite de cabra: revisão sistemática e meta-análise.

Artigo Publicado no Periódico Research in Veterinary Science (Qualis A1). DOI:
10.1016/j.rvsc.2021.01.004

Detecção de anticorpos e análise molecular para *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) em leite de cabra: Revisão sistemática e meta-análise.

João Paulo de Lacerda Roberto¹, Clécio Henrique Limeira¹, Nathanael Natércio da Costa Barnabé¹, Rafael Rodrigues Soares¹, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva¹, Albério Antônio de Barros Gomes¹, Severino Silvano dos Santos Higino¹, Sérgio Santos de Azevedo¹, Clebert José Alves^{1*}

Resumo

Paratuberculose constitui-se uma patologia infectocontagiosa incurável que acomete várias espécies, inclusive caprinos (*Capra hircus*). O agente etiológico é o *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) que tem tropismo pelo intestino, provocando anorexia, perda progressiva de peso e óbito. Nos caprinos a principal forma de contágio dar-se por via oral pela ingestão de água e alimentos contaminados por fezes de infectados. Os animais afetados também eliminam o agente através do leite, com potencial risco biológico a saúde pública. Dessa forma, objetivou-se com esta pesquisa realizar um levantamento da literatura disponível em meio eletrônico para revisão de forma sistemática, seguida de meta-análise dos resultados encontrados sobre prevalência e testes de diagnóstico adotados na detecção de anticorpos e DNA de MAP no leite. Foram empregados como parâmetros de busca: “*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* AND (goat OR small ruminant) AND (milk OR pasteurized milk)”. Obedecendo rigorosamente critérios preestabelecidos, 437 artigos foram selecionados nas respectivas bases eletrônicas de conteúdo científico: ScienceDirect (285), PubMed (68), Web of Science (60) e Scopus (24), dos quais, nove trabalhos foram eleitos à construção da revisão sistemática e meta-análise. A prevalência de MAP no leite variou entre 1.1 e 67.7% no Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), e 1.94 a 37.74% na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A meta-análise indicou uma prevalência geral combinada de 8.24%, porém com alta heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 98.7\%$). Constatou-se presença significativa de MAP no leite de cabra, implicando na necessidade de vigilância do agente, de forma a preservar a saúde pública e do rebanho.

Palavras-chave Caprinos. Paratuberculose. Leite. Saúde Pública.

Abstract

Paratuberculosis is an incurable infectious disease that affects several species, including goat (*Capra hircus*). The etiologic agent is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

(MAP) that has tropism for the intestine, causing anorexia, progressive weight loss and death. In goats, the main transmission route is the ingestion of water and food contaminated by infected feces. Affected animals also eliminate the agent through milk, with a potential biological risk to public health. Thus, the aim of this study was to conduct a research of the literature available in electronic media for a systematic review, followed by a meta-analysis of the results found on prevalence and diagnostic tests adopted in the detection of MAP antibodies and DNA in goat milk. The following search parameters were used: “*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*” AND (goat OR small ruminant) AND (milk OR pasteurized milk). Strictly obeying pre-established criteria, 437 articles were selected from the respective electronic databases of scientific content: ScienceDirect (285), PubMed (68), Web of Science (60) and Scopus (24), of which nine papers were elected to the construction of the systematic review and meta-analysis. The prevalence of MAP antibodies in milk detected by milk-ELISA ranged from 1.1 to 67.7% and the prevalence of MAP DNA in goat milk detected by MAP-specific polymerase chain reaction (PCR) ranged from 1.94 to 37.74%. A meta-analysis indicated a combined MAP infection prevalence of 8.24%, but with high heterogeneity among study findings ($I^2 = 98.7\%$). A significant presence of MAP was found in goat's milk, implying the need for surveillance of the agent, in order to preserve public and herd health.

Keywords: Goats, Paratuberculosis. Milk. Public health.

Introdução

A paratuberculose, ou doença de Johne constitui-se como uma patologia infectocontagiosa incurável, de distribuição global, que acomete diversas espécies de animais, incluindo ruminantes domésticos (principalmente bovinos, caprinos e ovinos) e selvagens, caracterizada por uma enterite crônica que resulta em diarreia, perda progressiva de peso, diminuição da produção e eventualmente, morte (World Organization for Animal Health - OIE, 2018). O agente etiológico é o *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP), uma bactéria intracelular facultativa, álcool-ácido resistente e de crescimento lento (Rathnaiah et al. 2017).

Diferente das demais micobactérias, o MAP apresenta tropismo pelo intestino, desencadeando enterite com linfadenite granulomatosa crônica, diarreia, perda progressiva de peso, desnutrição, redução da produção de leite e morte (Lombard, 2011). Cabras infectadas eliminam a bactéria nas fezes e no leite, possibilitando o contágio através da ingestão de água

ou alimentos contaminados ou durante a amamentação de animais jovens (Souza et al. 2016; Singh et al. 2019).

A excreção do MAP pelo leite de cabra também apresenta importância para a saúde pública, considerando as evidências que relacionam o agente à doença de Crohn em humanos e o fato de que o mesmo é resistente à pasteurização e a processos industriais que utilizam baixo aquecimento, permitindo sua sobrevivência em alguns alimentos de origem láctea e, conseqüentemente, possibilitando a transmissão para os consumidores (Windsor, 2015; Chaubey et al. 2017).

Por outro lado, a eliminação pelo leite permite o diagnóstico da infecção por MAP de maneira não invasiva, inclusive ainda no estágio II da doença, na qual os animais não demonstram sinais clínicos aparentes (Sukumar et al., 2014), podendo ser encontrada alta carga biológica do agente no leite (Chaubey et al. 2017; Singh et al. 2019). O isolamento e a identificação do MAP em cultura são considerados padrão ouro para diagnóstico da infecção no leite, porém é uma técnica laboriosa e que pode demandar até seis meses para se obter crescimento adequado (Singh et al. 2019), sendo recomendada principalmente na confirmação de casos clínicos (OIE, 2018).

Por este motivo, diversos testes diretos e indiretos têm sido pesquisados, isoladamente ou em associação (Singh et al. 2019), para diagnóstico de MAP no leite de cabra. Entre os testes indiretos, o ELISA é utilizado com mais frequência e indicado principalmente para análise de prevalência em países que adotam programas de vigilância, apresentando como vantagens a ampla disponibilidade no mercado, baixo custo e rapidez nos resultados, embora a sensibilidade geral ainda seja baixa, principalmente nos casos subclínicos (OIE, 2018; Lutikholt et al. 2019). Com relação as técnicas diretas, os testes moleculares, como a PCR e suas variações, apresentam resultados rápidos, com bons parâmetros de sensibilidade e especificidade, sendo capaz de identificar infecções no estágio II (assintomáticos) e possibilitam a tipificação do agente etiológico, embora apresentem ainda custos elevados para uso em sistemas de vigilância (Sukumar et al. 2014; Souza et al. 2016, Sange et al. 2019).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2018), a doença de Johne se enquadra como uma enfermidade de múltiplas espécies, sendo um problema para a pecuária e, possivelmente, à saúde humana, devendo, portanto, sua ocorrência ser notificada. Destaca-se assim a importância do aprofundamento na pesquisa sobre o MAP para o refinamento dos testes de diagnóstico, elaboração de estratégias eficientes na prevenção, controle e erradicação, garantindo sanidade aos animais de produção e segurança alimentar ao homem.

Tendo em vista os aspectos elencados acima e a escassez de trabalhos envolvendo detecção de anticorpos e DNA de MAP em leite de cabra, é importante que se conheça a realidade dos rebanhos frente à doença para o desenvolvimento de medidas de intervenção. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho realizar um levantamento da literatura disponível em meio eletrônico para revisão de forma sistemática, seguida de meta-análise dos resultados encontrados sobre prevalência e testes de diagnóstico adotados na detecção de anticorpos e DNA de MAP no leite.

Material e métodos

Estratégia de pesquisa e elegibilidade dos artigos

A pesquisa dos trabalhos primários foi realizada em quatro bancos de dados eletrônicos: MEDLINE/PubMed, ScienceDirect, Scopus e Web of Science. Foram utilizados como parâmetros de busca os termos “*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*” AND “goat OR small ruminant” AND “milk” OR “pasteurized milk” e todas as publicações encontradas foram exportadas em arquivo formato “BibTex” para o gerenciador bibliográfico Mendeley®, no qual duplicatas foram excluídas, possibilitando a leitura dos títulos e resumos dos trabalhos primários por três revisores, de forma independente. Buscou-se identificar artigos completos e comunicações breves que tratassem da paratuberculose na espécie *Capra hircus*. Não houve restrição quanto a idioma ou ano de publicação e as pesquisas foram realizadas entre 19 e 23 de outubro de 2019.

Critérios de inclusão e exclusão.

Após consenso dos três revisores, os seguintes critérios de inclusão foram preestabelecidos: (1) estudos transversais de prevalência de MAP em leite de cabra; (2) ELISA (método indireto) e PCR (método direto) como ferramentas de diagnóstico. Os títulos e resumos foram analisados e incluídos se atendessem aos critérios. A seleção das publicações ocorreu com base na metodologia empregada e na relevância das informações.

Foram excluídos trabalhos com abordagem do agente etiológico em outras espécies de ruminantes domésticos (*Bos taurus*, *Bos indicus* e *Ovis aries*, por exemplo), os que tratavam das características clínicas/anatomopatológicas da doença, os que usaram outro material biológico que não fosse leite para o diagnóstico (vísceras e sangue, por exemplo) e também pesquisas que utilizaram amostras de tanque a granel.

Após serem considerados aptos apenas artigos completos e short communications foram avaliados na íntegra e de forma totalmente independente por três revisores. Discordâncias quanto à inclusão foram resolvidas de forma consensual.

Extração e análise dos dados

Uma planilha eletrônica foi formulada pelos autores para garantir consistência/confiabilidade aos dados, preenchida com informações sobre: título, autores, país de origem, ano de publicação, material coletado, método de diagnóstico, amostra total e número de positivos.

A meta-análise dos dados quantitativos foi realizada mediante modelo de efeitos aleatórios, estimando a prevalência combinada do MAP no leite de cabra por subgrupos, de acordo com a técnica de diagnóstico utilizada (ELISA ou PCR). Avaliou-se heterogeneidade pelo teste Q de Cochran e o nível de inconsistência pelo teste I² de Higgins e Thompson, utilizando-se o programa estatístico R versão 3.5.1 (R Core Team, 2019), sob interface do software RStudio.

Resultados

A figura 01 corresponde ao fluxograma de busca, no qual observa-se inicialmente 437 artigos identificados nas quatro bases eletrônicas de dados: ScienceDirect (285), PubMed (68), Web of Science (60) e Scopus (24). Após verificação de duplicatas, 64 artigos foram excluídos. Deste modo, 373 foram elegíveis à leitura de títulos e resumos. Após esse procedimento, chegou-se ao número de 24 registros a serem lidos na íntegra. Com a consequente eliminação de artigos que não exploravam leite de cabra como material para diagnóstico, outros que abordavam comparação da eficácia de testes e alguns com infecção experimental, chegou-se ao número de nove artigos aptos. Um estudo (Kumar et al. 2008) utilizou as duas técnicas de diagnóstico (ELISA e PCR), somando-se 10 resultados para cálculo da meta-análise (Tabela 1).

Os estudos foram conduzidos em nove países (Alemanha, Brasil, Chile, Estados Unidos, Grécia, Holanda, Índia, Noruega e Polônia) de três continentes (América, Ásia e Europa), publicados entre os anos 2003 e 2019. Ressalta-se o trabalho de Munjal et al. (2004), que abrangeu rebanhos originários da Alemanha, Índia e Polônia.

As prevalências individuais, bem como as técnicas de diagnóstico e demais informações sobre as pesquisas primárias estão disponíveis na Tabela 1. No resultado geral da meta-análise, a prevalência combinada de amostras de leite positivas para o MAP foi 8.24%,

porém o teste Q de Cochran ($p < 0,01$) e a estatística I^2 de Higgins e Thompson ($I^2 = 99\%$) detectaram alta heterogeneidade (Figura 2). Com isso, adotou-se o modelo de efeitos aleatórios por subgrupos como forma de estimar a combinação dos resultados, com prevalências de 8.67% para ELISA e 7.6% na PCR (Figura 2; Tabela 2). A análise do gráfico de funil (Figura 3) demonstra uma distribuição assimétrica dos pontos (que representam os estudos incluídos na meta-análise), o que sugere presença de viés de publicação.

Discussão

Nesta revisão sistemática e meta-análise a baixa quantidade de artigos sobre presença de MAP no leite de cabra revela que a pesquisa sobre paratuberculose nesta espécie é limitada. Windsor (2015) destaca que nos países desenvolvidos, principalmente, a paratuberculose em caprinos é pouco conhecida e esse fato pode ser atribuído à menor importância comercial quando comparados aos ovinos e bovinos. Constata-se que a possível participação do agente na doença de Crohn, evidenciada por isolados a partir de amostras de intestino e nódulo linfático de humanos enfermos (Chiodini and Rossiter, 1996), elevou a doença de Johne a um novo patamar, despertando maior interesse da comunidade científica. Outra informação que fundamenta tal teoria de contemporaneidade é o grande número de trabalhos sobre padronização de testes diagnósticos encontrados durante a seleção dos artigos, comprovando estágio de desenvolvimento das técnicas.

Quanto aos locais de realização dos estudos, a maioria foi conduzida na Europa e América. Pelo processo de busca nas bases eletrônicas de dados não se encontrou pesquisa efetuada na África, continente que possui considerável produção de leite caprino. Ademais, importantes bacias leiteiras do Brasil não foram investigadas, como as do nordeste do país.

Ao analisar as informações contidas na tabela 1, observa-se uma prevalência muito variável entre os estudos, com valores de 1.11% encontrado por Lutikholt et al (2019) em cabras leiteiras não vacinadas na Holanda e Países Baixos, até os 67.70% reportados por Kumar et al (2008) na Índia, ambos utilizando testes de ELISA no leite, com algumas variações. Essa amplitude na taxa de prevalência de MAP no leite de cabra pode estar relacionada ao país onde se executou estudo, sofrendo influência de fatores não mensurados como clima, regime de sistema produtivo, tecnificação, assistência profissional, entre outros, que contribuíram para alta heterogeneidade. Inquéritos soropidemiológicos têm associado a infecção por MAP em caprinos a fatores ligados ao manejo e sistema de produção, que podem variar de um país para outro. Em países desenvolvidos, como a Espanha, por exemplo, os pesquisadores encontraram uma associação significativa entre e infecção por MAP e a

produção intensiva, no qual segundo os autores, a alta densidade facilita a transmissão horizontal entre animais, por meio de contatos entre eles (Barrero-Domínguez et al (2019). No Brasil, considerado um país em desenvolvimento, onde a maioria das criações de caprinos são para subsistência, os pesquisadores associaram um maior risco de ocorrência de MAP cabras positivas ao não uso de tecnologias (Freitas et al., 2015).

A prevalência combinada entre os estudos foi de 8.24% (3.22 – 19.51%), indicando detecção de anticorpos e DNA de MAP no leite de cabra em países dos três continentes representados, podendo refletir em risco à saúde humana, pois os processos de tratamento térmico (como pasteurização e defumação) empregados atualmente podem ser ineficazes na sua completa eliminação do agente (Windsor, 2015; Chaubey et al. 2017).

Devido à alta heterogeneidade encontrada na meta-análise, os estudos foram divididos em subgrupos, de acordo com o método de diagnóstico utilizado. Por essa abordagem, observou-se que a heterogeneidade entre estudos do mesmo subgrupo permaneceu alta (Figura 2). Por outro lado, o teste Q de Cochran não indicou heterogeneidade entre os dois subgrupos ($p=0.886$), possibilitando uma combinação de prevalências entre as pesquisas que utilizaram o ELISA e PCR (Tabela 2), mesmo sendo um teste indireto e outro direto, respectivamente, e com atributos de sensibilidade e especificidade diferentes para detecção de MAP no leite (Kumar et al. 2008; Munjal et al. 2004).

Entre as pesquisas que usaram ELISA como teste diagnóstico a prevalência variou de 1.1% (Luttikholt et al., 2019) a 67.7% (Kumar et al., 2008), conforme demonstrado na Tabela 1. Os testes de ELISA-Milk são os mais comumente usados, devido à ampla disponibilidade no mercado, rapidez nos resultados e baixo custo, contudo a sensibilidade do teste é insuficiente quando a infecção é subclínica, uma vez que a resposta imune humoral é tardia, impedindo a identificação precoce de animais infectados (Luttikholt et al. 2019; Stabel et al. 2020).

Por outro lado, modificações e adaptações nos testes de ELISA usando leite de cabra como material de escolha tem permitido melhorias na sensibilidade da técnica. Singh et al (2019) observaram uma sensibilidade de 57.4% usando o dot-ELISA em amostras de leite de cabra, avaliando ser um bom teste para triagem em massa. Em outra pesquisa, Luttikholt et al (2019) comparou o ELISA de soro sanguíneo ao de leite de cabra, demonstrado sensibilidade de 58.4% e especificidade de 98.5%. Utilizando um ELISA modificado para testagem de amostras de tanque a granel, Bauman et al (2019) observaram que a sensibilidade variou de 33.3 a 34.8% quando a cultura fecal e a PCR foram os testes de referência, respectivamente

(com especificidade de 100%) e 87.5% quando o ELISA do soro foi o teste de referência (com especificidade de 95.2%).

Desse modo, conforme observado por Angelidou et al (2014a), os testes de ELISA com soro sanguíneo e leite possuem sensibilidade e especificidades compatíveis, sendo o leite um material mais fácil e rápido de coletar e não invasivo, podendo servir como ferramenta diagnóstica de escolha nos programas de vigilância e controle da paratuberculose que requerem testes frequentes.

Assim como no ELISA, os resultados da PCR indicam resultados muito variáveis na prevalência de paratuberculose detectada no leite de cabra, com valores de 1.94% no Brasil (Souza et al. 2016) até 37.74% na Índia (Kumar et al. 2008). A PCR tem sido utilizada na confirmação do MAP em amostras de fezes, leite, tecidos e culturas, permitindo uma identificação rápida e segura (Windsor, 2015; Galiero et al. 2017). A maioria das técnicas de PCR utilizam primers direcionados ao gene IS900, que possui alta especificidade para o MAP, porém com baixa sensibilidade quando comparada a outras técnicas de diagnóstico direto (Singh et al. 2019).

As pesquisas atuais são divergentes quanto ao uso de PCR para diagnóstico do MAP no leite de cabras. Nebbia et al., (2006) e Sukumar et al (2014) utilizaram Nested e PCR convencional e conseguiram diagnosticar a infecção em cabras leiteiras ainda no estágio assintomático da doença, quando os animais não apresentam sinais clínicos aparentes. Por outro lado, Lievaart-Peterson et al (2019) descrevem uma sensibilidade limitada de PCR para detectar DNA de MAP em amostras de leite de cabras com histórico de infecção de MAP na Holanda.

No Canadá, Bauman et al., (2019) encontraram sensibilidade de 0,0% na PCR em leite de cabra, utilizando amostras do tanque de leite a granel (BTM), e sugeriram que o ELISA modificado teria um desempenho melhor, se o objetivo fosse o uso por unidades de processamento e programas de controle, visando aumentar a probabilidade de identificação de animais que excretam ativamente o MAP no leite, ou se o uso for por produtor que deseja um teste mais sensível, capaz de identificar individualmente animais positivos, o uso de PCR fecal em amostras de 20 caprinos seria o método de escolha.

Alguns problemas identificados como responsáveis pela baixa sensibilidade da PCR no leite de pequenos ruminantes foram a pouca quantidade de MAP eliminada e também a presença de certas substâncias no leite que podem inibir o desempenho da técnica, além do padrão de excreção intermitente em cabras assintomáticas (Nebbia et al., 2006; Galiero et al. 2017; Bauman et al. 2018; Singh et al. 2019). Além disso, ao utilizar testes de diagnóstico

direto no leite de cabra, como a PCR, deve-se ter atenção na possibilidade de contaminação ascendente pelo canal do teto, pelo qual o MAP contaminaria o leite, mas não o animal (Schwarz et al. 2017). Assim, em fazendas com um nível mais alto de mecanização, a sensibilidade da PCR do leite pode ser menor, devido ao maior cuidados com a higiene no processo de ordenha, o que reduz a contaminação fecal das tetas (Bauman et al., 2019).

Embora apresente problemas de sensibilidade, a PCR pode ser utilizada como teste confirmatório, apresentando maior taxa de detecção em amostras com maior carga biológica de MAP no leite (Singh et al. 2019), como em animais com perda progressiva de peso e também aqueles positivos no teste de ELISA (Galiero et al. 2017, Bauman et al. 2018).

Com relação à análise do viés de publicação (Figura 3), os pontos que representam as pesquisas incluídas estão assimetricamente distribuídos na área de plotagem do gráfico, o que sugere presença de viés de publicação. Porém o pequeno número de resultados em cada subgrupo impossibilitou o uso de testes estatísticos para determinar a simetria do gráfico de funil. No entanto, a assimetria no gráfico pode resultar não de uma subnotificação sistemática de resultados negativos (menores prevalências), mas também de outros fatores, como a diferença essencial entre estudos menores e maiores que resulta da variabilidade inerente entre eles, gerado uma alta heterogeneidade que pode tornar o gráfico assimétrico (Lau et al. 2006; Sterne et al. 2011).

Houve um número limitado de artigos sobre a presença de MAP em leite de cabra, que revela um potencial risco biológico para as pessoas e implica a necessidade de vigilância ativa do agente. O leite é considerado um bom material biológico para ser usado no diagnóstico da paratuberculose, em programas de controle e vigilância que requerem quantias consideráveis de amostras. Para tanto, os testes ELISA e PCR são promissores, embora ainda precisem de validação e melhorias em termos de sensibilidade / especificidade e aplicabilidade para uso rotineiro na produção cadeia de leite de cabra.

Referências

Angelidou, E., Kostoulas, P., Leontides, L., 2014a. Bayesian validation of a serum and milk ELISA for antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Greek dairy goats across lactation. *Journal of Dairy Science*, 97, 2, 819-828. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7218>

Bauman, C.A., Jones-Bitton, A., Jansen, J., Kelton, D., Menzies, P., 2019. Evaluation of bulk tank milk PCR and bulk tank milk modified ELISA tests for the detection of paratuberculosis

at the herd level in goat and sheep dairies in Ontario, Canada. *Journal of Dairy Science*, 102, 1, 511-520. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15020>

Barrero-Domínguez, B., Luque, I., Huerta, B., Gomez-Laguna, J., Galán-Relaño, Á., Gómez-Gascón, L., Astorga, R.J., 2019. Paratuberculosis in dairy goat flocks from southern Spain: Risk factors associated with seroprevalence. *Veterinary Record*, 185, 19, 600. <https://doi.org/10.1136/vr.105465>

Chaubey, K.K., Singh, S.V., Gupta, S., Singh, M., Sohal, J.S., Kumar, N., Singh, M.K., Bhatia, A.K., Dhama, K., 2017. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* - an important food borne pathogen of high public health significance with special reference to India: an update, *Veterinary Quarterly*, 37, 1, 282-299. <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1397301>

Chiodini, R.J., Rossiter, C.A., 1996. Paratuberculosis: A potential zoonosis? *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12, 2, 457-467. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30417-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30417-5)

Djonne, B., Jensen, M.R., Grant, I.R., Holstad, G., 2003. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Veterinary Microbiology*, 92, 135-143. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00355-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00355-3)

Freitas, T.D., Azevedo, S.S., Silva, M.L.C.R., Garino-Júnior, F., Santos, C.S.A.B., Clementino, I.J., Amaral, F.R., and Alves, C.J., 2015. Epidemiological characterization and risk factors associated with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection in dairy goats in the Brazilian Semiarid region. *Semina. Ciências Agrárias*, 36, 1, 267-276. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n1p267>

Galiero, A., Turchi, B., Pedonese, F., Nuvoloni, R., Cantile, C., Colombani, G., Forzan, M., Cerri, D., Bandecchi, P., Fratini, F., 2017. Serological, culture and molecular survey of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in a goat flock in Tuscany. *Folia Microbiologica*, 62, 6, 471-477. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0518-7>

Iarussi, F., Paradies, P., Sardaro, R., Rubino, G., Scaltrito, D., Pieragostini, E., Petazzi, F., 2019. Epidemiology and risk factors of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semi-extensive dairy sheep and goat farms of Apulia, southern Italy. *Small Ruminant Research*, 177, 89-96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.06.016>

Kumar, S., Singh, S.V., Sevilla, I., Singh, A.V., Whittington, R.J., Juste, R.A., Sharma, G., Singh, P.K., Sohal, J.S., 2008. Lacto-prevalence, genotyping of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and evaluation of three diagnostic tests in milk of naturally infected goatherds. *Small Ruminant Research*, 74, 1, 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.03.005>

Lau, J., Ioannidis, J.P.A., Terrin, N., Schmid, C.H., Olkin, I., 2006. The case of the misleading funnel plot. *BMJ*, 333, 597-600. <https://doi.org/10.1136/bmj.333.7568.597>

Lombard, J.E., 2011. Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27, 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.012>

Lievaart-Peterson, K., Luttkholt, S., Gonggrijp, M., Ruuls, R., Ravestloot, L., and Koets, A.P. 2019. *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* DNA and Antibodies in Dairy Goat Colostrum and Milk. *Veterinary Sciences*, 6, 4, 96. <https://doi.org/10.3390/vetsci6040096>.

Luttkholt, S., Lievaart-Peterson, K., Gonggrijp, M., Aalberts, M., Van Schaik, G., Vellema, P., 2019. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA Responses in Milk Samples from Vaccinated and Nonvaccinated Dairy Goat Herds in The Netherlands. *Veterinary Sciences*, 6, 58. <https://doi.org/10.3390/vetsci6020058>

Munjal, S.K., Boehmer, J., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K., Homuth, M., 2004. Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of paratuberculosis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 103, 1-2, 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.07.019>

Nebbia, P., Robino, P., Zoppi, S., and Meneghi, D. 2006. Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Ruminant Research*, 66, 1-3, 116-120.

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.049>

OIE 2018. World Organization for Animal Health. Available from https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.15_PARATB.pdf. Acesso em: 16 Fev 2020.

R Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from <https://www.Rproject.org/>. Access 10 Feb 2020.

Rathnaiah, G., Zinniel, D.K., Bannantine, J.P., Stabel, J.P., Gröhn, Y.T., Collins, M., Barletta, R.G., 2017. Pathogenesis, Molecular Genetics, and Genomics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the Etiologic Agent of Johne's Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 187. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00187>

Sange, M.D., Becker, A., Hassan, A.A., Bulte, M., Ganter, M., Siebert, U., Abdulmawjood, A., 2019. Development and validation of a loop-mediated isothermal amplification assay-a rapid and sensitive detection tool for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in small ruminants. *Journal of Applied Microbiology*, 127, 1, 47-58. <https://doi.org/10.1111/jam.14284>

Salgado, M., Kruze, J., Collins, M.T., 2007. Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 1, 99-102. <https://doi.org/10.1177/104063870701900117>

Salgado, M., Manning, E.J.B., Collins, M.T., 2005. Performance of a Johne's disease enzyme linked immunosorbent assay adapted for milk samples from goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, 350-354. <https://doi.org/10.1177/104063870501700408>

Singh, M., Gupta, S., Chaubey, K., Singh, S., Sohal, J., 2019. Profiling of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the milk of lactating goats using antigen- antibody based assays. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 64, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.02.006>

Souza, M.C.C., Lima, M.C., Braga, I.F.E., Schwarz, D.G.G., Rodrigues, A.N.S., Sales, E.B., Junior, A.N.F., Moreira, A.M.S., 2016. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) isolated from dairy goats in Brazil. *Small Ruminant Research*, 140, 18-21. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.009>

Stabel, J.R., Bannantine, J.P., Hostetter, J.M., 2020. Comparison of Sheep, Goats, and Calves as Infection Models for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 225, 110060. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2020.110060>

Sterne, J.A.C., Sutton, A.J., Ioannidis, J.P., Terrin, N., Jones, D.R., Lau, J., Carpenter, J., Rücker, G., Harbord, R.M., Schmid, C.H., Tetzlaff, J., Deeks, J.J., Peters, J., Macaskill, P., Schwarzer, G., Duval, S., Altman, D.G., Moher, D., Higgins, J.P., 2011. Recommendations for Examining and Interpreting Funnel Plot Asymmetry in Meta- Analyses of Randomised Controlled Trials. *BMJ*, 22, 343, 4002. <https://doi.org/10.1136/bmj.d4002>

Sukumar, B., Gunaseelan, L., Porteen, K., Prabu, K., 2014. Goat milk as a non-invasive sample for confirmation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by IS900 PCR. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 1, 3, 136-139. <https://doi.org/10.5455/javar.2014.a25>

Schwarz, D.G.G., Lima, M.C., Barros, M., Valente, F.L., Scatamburlo, T.M., Rosado, N., Oliveira, T.S.A.M., Oliveira, L.L., Moreira, M.A.S., 2017. Short communication: Passive shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in commercial dairy goats in Brazil. *Journal of Dairy Science*, 100, 10, 8426-8429. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12918>

Van Hulzen, K.J.E., Koets, A.P., Nielen, M., Hoeboer, M., Van Arendonk, J.A.M., Heuven, H.C.M., 2012. Genetic variation for infection status as determined by a specific antibody response against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of Dutch dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 95, 10, 6145-6151. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5616>

Windsor, P.A., 2015. Paratuberculosis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 181, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.019>

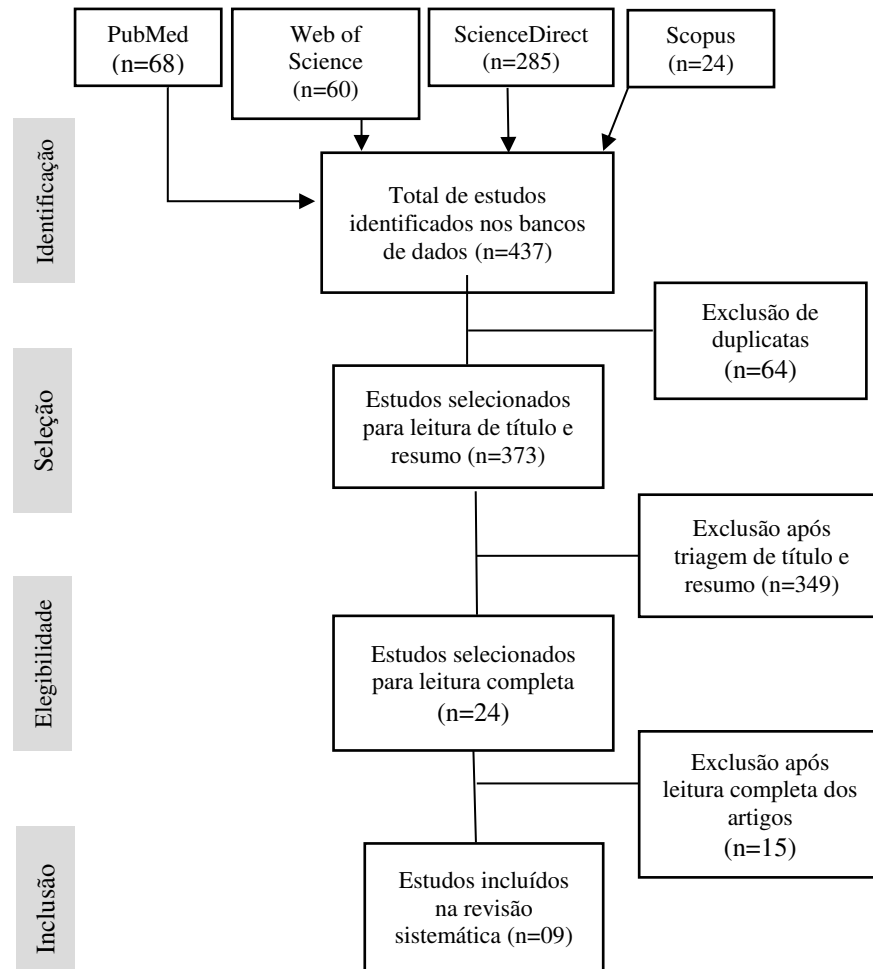


Figura 1. Fluxograma do processo de busca, seleção e inclusão de estudos na revisão sistemática e meta-análise.

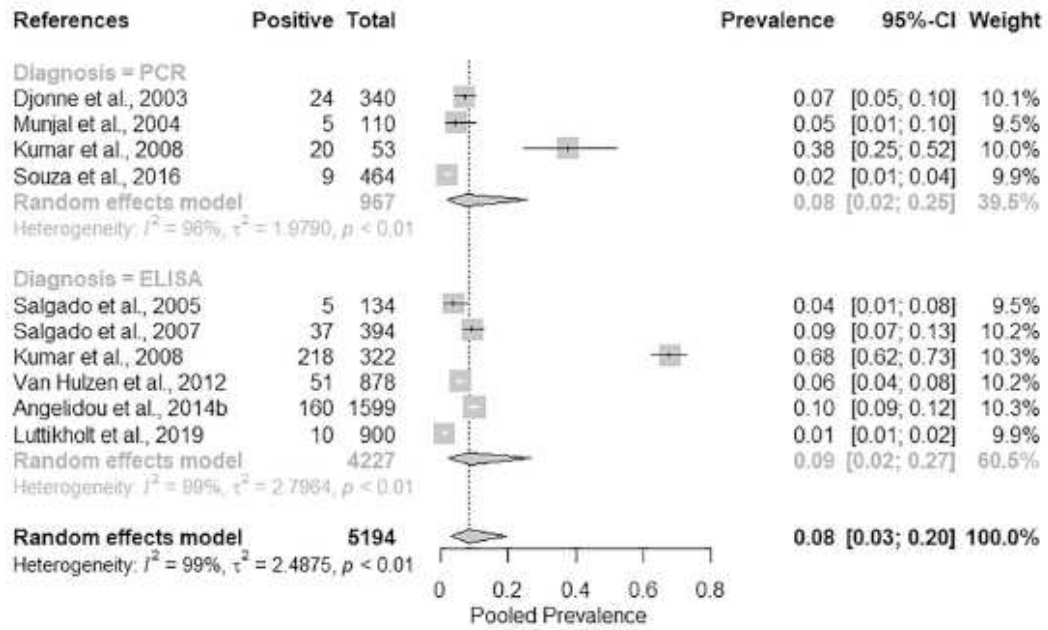


Figura 2. Avaliação combinada dos 09 estudos sobre prevalência de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* em leite de cabra.

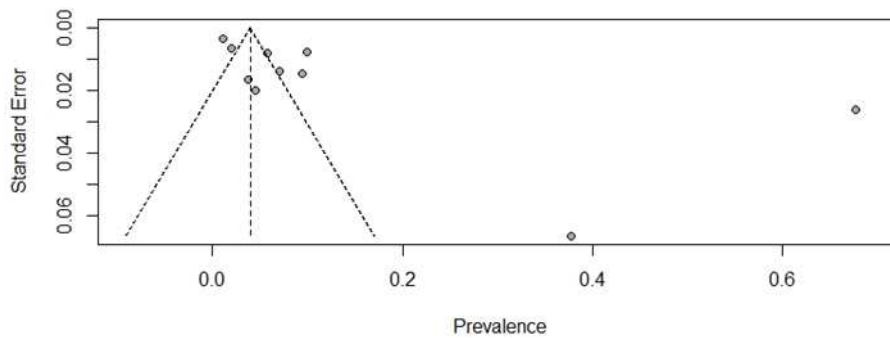


Figura 3. Apresentação da distribuição assimétrica no gráfico de funil dos estudos sobre prevalência de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* no leite de cabra.

Tabela 2. Aspectos gerais da prevalência de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* em leite de cabra nos 09 estudos aptos à revisão sistemática e meta-análise.

Referências	País	Amostra	Positivos	Método	Prevalência (IC-95%)
Djonne et al., 2003	Noruega	340	24	PCR	7,06 % (4,57 - 10,32%)
Munjal et al., 2004	Alemanha, Índia e Polônia	110	5	PCR	4,55% (1,49 - 10,29%)
Salgado, Manning e Collins, 2005	USA	134	5	ELISA	3,73% (1,22 - 8,49%)
Salgado, Cruze e Collins, 2007	Chile	394	37	ELISA	9,39% (6,70 - 12,71%)
Kumar et al., 2008 (ELISA)	Índia	322	218	ELISA	67,70% (62,29 - 72,78%)
Kumar et al., 2008 (PCR)	Índia	53	20	PCR	37,74% (24,79 - 52,11%)
Van Hulzen et al., 2012	Holanda/Países baixos	878	51	ELISA	5,81% (4,36 - 7,57%)
Angelidou et al., 2014b	Grécia	1599	160	ELISA	10,01% (8,58 - 11,58%)
Souza et al., 2016	Brasil	464	9	PCR	1,94% (0,89 - 3,65%)
Luttikholt et al., 2019	Holanda/Países baixos	900	10	ELISA	1,11% (0,53 - 2,03%)

Tabela 2. Resultado sumarizado da meta-análise sobre prevalência de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* em leite de cabra.

Subgrupo	N	Amostra	Positivos	Prevalência (IC - 95%)	Heterogeneidade	
					(Teste Q)*	I ²
Diagnóstico ELISA	6	4227	481	8,67% (2,4 - 26,86%)	<0,01	99,20%
Diagnóstico PCR	4	967	58	7,60% (1,96 - 25,32%)	<0,01	95,60%
Prevalência combinada	10	5194	539	8,24% (3,22 - 19,51%)	<0,01	98,70%

N = número de estudos. *Não se identificou heterogeneidade entre os subgrupos pelo Teste Q (p=0,886).

CAPITULO II: Caracterização molecular do *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) em leite de cabras destinado ao processamento em usinas de beneficiamento da região semiárida do Nordeste Brasileiro.

Artigo submetido ao Periódico Small Ruminant Research (Qualis A3).

Caracterização molecular do *Mycobacterium avium* subspécies *paratuberculosis* (MAP) em leite de cabras destinado ao processamento em usinas de beneficiamento da região semiárida do Nordeste brasileiro.

João Paulo de Lacerda Roberto^a, Clécio Henrique Limeira^a, João Pessoa Araújo Júnior^b, Camila Dantas Malossi^b, Leila Sabrina Ullmann^b, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva^a, Severino Silvano dos Santos Higino^a, Sergio Santos de Azevedo^a, Clebert José Alves^{*a}

*Corresponding Author: **Clebert José Alves**, Transmissible Disease Research Group, Federal University 6 of Campina Grande, Patos, PB, Brazil; e-mail: clebertja@uol.com.br

Resumo: A criação de caprinos no Brasil aumentou nos últimos anos, e o rebanho ultrapassou 8,2 milhões de cabeças, com o Nordeste concentrando 93% de todo o efetivo e o estado da Paraíba sendo considerado o maior produtor de leite de cabras do país. Considerando o *Mycobacterium avium* subspécies *paratuberculosis* (MAP) como um problema sanitário para o desenvolvimento da pecuária e com riscos para a saúde humana e que sua ocorrência deve ser notificada, foi estruturado o trabalho de pesquisa que teve como objetivo confirmar a presença e realizar a caracterização molecular do MAP no leite de cabras destinados ao processamento em usinas de beneficiamento da região semiárida do Nordeste brasileiro. Foram analisadas amostras de 179 unidades de produção, cinco tanques coletivos e quatro amostras do leite de cabra pasteurizado. A Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) foi usada como teste molecular. O material genético (DNA) de MAP foi encontrado na amostra de leite de cabra de uma unidade de produção (1/179). A partir dessa amostra positiva, nove cabras em lactação foram identificadas na propriedade de origem e sete delas apresentaram DNA de MAP em amostras de leite (77,77%). O estudo constatou pela primeira vez a presença do *Mycobacterium avium* subspécies *paratuberculosis* no leite de cabras na região semiárida do Brasil, o que revela o potencial risco biológico ao homem e implica na necessidade de vigilância ativa do agente.

Palavras-chave: Paratuberculose, Doença de Johne, Caprino, Leite, PCR.

Abstract: Goat farming has been on the rise in Brazil in recent years, with the national herd with over 8.2 million heads. Overall, 93% of the national herd is concentrated in the Northeast, with the state of Paraíba being the largest goat milk producer in the country. Considering *Mycobacterium avium* subspécies *paratuberculosis* (MAP) as a sanitary issue for the development of animal farming with risks for human health and that is a notifiable disease, this research was structured with the objective of confirming the presence and performing a molecular characterization of MAP in goat milk destined for processing plants in the semiarid region of the Brazilian Northeast. Samples from 179 production units and five collective bulk tanks and four samples of pasteurized goat milk were analyzed. Real-time polymerase chain reaction (qPCR) was used as a molecular test. Genetic material (DNA) for MAP was found in the goat milk sample from one production unit (1/179). From this positive sample, nine lactating goats were identified in the original property, seven of which showed MAP DNA in milk samples (77.77%). This study identified for the first time the presence of *Mycobacterium avium* subspécies *paratuberculosis* in the milk from goats in the semiarid region of Brazil, which shows the potential biological risk to humans and suggests the need for active surveillance of the agent.

Keywords: Paratuberculosis, Johne's disease, Caprine, Milk, PCR.

^aTransmissible Disease Research Group, Federal University of Campina Grande, Patos, PB, Brazil; e-mail:

a Transmissible Disease Research Group, Federal University of Campina Grande, Patos, PB, Brazil; e-mail: jpaylor@outlook.com, sergio.santos@professor.ufcg.edu.br, clebertja@uol.com.br, luacristiny@yahoo.com.br, severino.silvano@professor.ufcg.edu.br, cleciolimeira@gmail.com.
b São Paulo of University; e-mail joao.pessoa@unesp.br, camilamalossi@gmail.com, leila_ullmann@yahoo.com.br.

Introdução

A criação de caprinos no Brasil aumentou nos últimos anos, e o rebanho ultrapassou 8,2 milhões de cabeças, sendo o Nordeste detentor de 93% do efetivo caprino do país, principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí e Paraíba (IBGE, 2019). A exploração da caprinocultura leiteira como atividade econômica, tem se mostrando cada vez mais relevante, estabelecendo-se como uma alternativa economicamente viável para produtores rurais em diversas regiões do país, especialmente na região Nordeste.

A Paraíba possui o quinto maior efetivo caprino do país, sendo o estado brasileiro que mais produz leite de cabra, com 5.627.000 de litros/ano, devido à implementação de programas que incentivam o fortalecimento da cadeia produtiva de caprinos no estado e pela adaptabilidade que essa espécie apresenta frente às adversidades do semiárido (Haenlein 2004; IBGE, 2019). Porém alguns gargalos impedem o pleno desenvolvimento da caprinocultura leiteira no semiárido brasileiro, incluindo problemas de manejo e sanitários que causam prejuízos econômicos e risco de transmissão de zoonoses, como, por exemplo, a ocorrência de paratuberculose em rebanhos da região (Freitas et al., 2015).

Também chamada de doença de Johne, a paratuberculose constitui-se como uma patologia infectocontagiosa incurável, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis* (MAP), uma bactéria intracelular facultativa, resistente a álcool-ácido e de lento crescimento (Rathnaiah et al., 2017). Possui uma distribuição global e acomete diversas espécies de animais, incluindo ruminantes domésticos (principalmente bovinos, caprinos e ovinos) e selvagens (Windsor 2015). O MAP apresenta um tropismo pelo intestino, que a diferencia das demais micobactérias, e os animais afetados apresentam uma enterite com linfadenite granulomatosa crônica resultando em diarreia, perda progressiva de peso, desnutrição, diminuição da produção de leite e óbito (Lombard, 2011; World Organization for Animal Health - OIE, 2018).

As cabras infectadas excretam a bactéria (MAP) no leite e nas fezes, viabilizando o contágio através da ingestão de água ou alimentos contaminados ou durante a amamentação de animais jovens (Patel e Shah, 2011). Através dessa eliminação é permissível realizar o diagnóstico da infecção no leite por MAP de maneira não invasiva e ainda no estágio II da doença, no qual não se observa sinais clínicos aparentes (Sukumar et al., 2014), tendo potencial para ser encontrada alta carga do agente nesse tipo de material biológico (Singh et al., 2019).

A técnica padrão ouro utilizada para o diagnóstico da infecção no leite de cabra é o isolamento e a identificação do MAP em cultura, porém devido ao seu crescimento lento é mais indicada na confirmação de casos clínicos (OIE, 2018; Singh et al., 2019). Desse modo testes diretos e indiretos têm sido pesquisados, isoladamente ou em associação, para obtenção de diagnóstico mais rápido e utilizando-se material biológico de fácil obtenção (Singh et al., 2019, Roberto et al., 2021). As técnicas diretas, como a PCR, expõem resultados rápidos e foi capaz de detectar infecções assintomáticas através de amostras de leite de cabras (Sukumar et al., 2014), viabilizando a tipificação do agente etiológico. Em contrapartida, seu custo é considerado elevado para uso em sistemas de vigilância que necessite de amostras individuais nos animais do rebanho (Souza et al., 2016, Sange et al., 2019).

Estudos sorológicos sobre a ocorrência de MAP em rebanhos caprinos na Paraíba, através da realização de testes de ELISA, foram conduzidos por Freitas et al., (2015) que relataram uma prevalência de 0,82% de caprinos leiteiros e de 6,97% das propriedades com pelo menos um animal positivo para MAP. Em outro estudo, Medeiros et al., (2012) detectaram anticorpos contra MAP em 22,91% dos animais testados.

A coleta de amostras para testes sorológicos requer certo grau de desconforto para os animais, tornando as amostras de leite mais convenientes, principalmente se o objetivo for realização de testes frequentes para implementação de programas de vigilância e controle (Roberto et al., 2021).

Considerando a paratuberculose como um problema sanitário para o desenvolvimento da pecuária e com riscos para a saúde humana, sua ocorrência deve ser notificada (OIE, 2018). Destaca-se assim a importância do aprofundamento na pesquisa sobre o MAP para o refinamento dos testes de diagnóstico, elaboração de estratégias eficientes na prevenção, controle e erradicação, garantindo sanidade aos animais de produção e segurança alimentar ao homem. Desta forma, o objetivo desse estudo foi confirmar a presença e realizar a caracterização molecular do MAP no leite de cabras destinados ao processamento em usinas de beneficiamento da região semiárida do nordeste brasileiro.

Material e métodos

Área do estudo e seleção dos municípios.

O estudo foi realizado na região intermediária de Campina Grande, nos municípios de Amparo, Prata, Sumé e Monteiro (Figura 1), todos situados no semiárido do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

A região da pesquisa possui clima característico de semiárido, com temperatura média de 22 ° C e altitude de 599 metros acima do nível do mar. É uma região conhecida pela produção de leite de cabra tanto na Paraíba quanto no Brasil. Entre os municípios incluídos na pesquisa, Monteiro é o que possui o maior número efetivo de caprinos do estado com 27.060 animais e Sumé em terceiro lugar com 20.273 cabeças (IBGE, 2019), tornando a caprinocultura uma atividade importante para a região.

Os municípios foram selecionados por possuírem usinas de coleta e/ou beneficiamento que recebem leite de cabra de 460 produtores, o que corresponde a cerca de 37% dos produtores de leite de cabra do estado da Paraíba cadastrados no Programa Leite Paraíba (Paraíba, 2015).

Delineamento Amostral

As amostras foram coletadas entre os meses de agosto e outubro de 2019, período considerado não chuvoso, e realizado em três etapas: a primeira deu-se no tanque individual de cada produtor ao chegar na usina de processamento, antes de ser misturado ao tanque coletivo; a segunda ocorreu após a mistura do leite de todos os produtores no tanque coletivo; e a terceira coleta foi realizada após a pasteurização do leite. Após os resultados das análises, outra coleta em cabras em lactação foi realizada individualmente na unidade de produção que apresentou resultado positivo. O número mínimo de propriedades por municípios visitadas foi calculado utilizando uma lista de 460 produtores dos municípios que entregavam leite de cabra nas usinas de beneficiamento, sendo selecionadas aleatoriamente 179 unidades de produção (Thrusfield, 2007).

Atividades de campo

No total foram obtidas 179 amostras de leite de cabra das unidades de produção, cinco de tanques coletivos, quatro de leite pasteurizado e nove de cabras em lactação. Todos os produtores que entregaram leite nas usinas ou tanques de recebimento no dia da coleta tiveram suas amostras analisadas. Em todas as unidades de recebimento, o leite de cabra foi colhido após a pesagem, em uma amostra única por tanque individual. Foram coletados 50ml de leite de cabra *in natura* em tubos tipo Falcon estéreis e livres de DNA, previamente identificados. A coleta de leite das cabras individuais foi realizada após a limpeza e desinfecção dos tetos, sendo desprezados os três primeiros jatos e coletados 25ml de leite em cada teto diretamente nos tubos Falcon. Após coletadas, as amostras foram acondicionadas sob refrigeração em caixa isotérmica e encaminhadas ao laboratório de doenças transmissíveis, da Universidade Federal de Campina Grande, campus de Patos, e mantidas congeladas até o momento de realização das análises.

Extração do material genético

A extração do material genético ácido desoxirribonucleico (DNA) das amostras de leite foi realizada usando o Kit Dneasy Blood and Tissue (Qiagen®, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi realizada como descrito por Albuquerque et al. (2017), utilizando-se os primers específicos da região IS900 do MAP, DF – 5' - GACGACTCGACCGCTAATTG-3' e DR – 5' -CCGTAACCGTCATTGTCCAG-3'. Como controle positivo foi utilizado uma cultura de *M. paratuberculosis* isolada de bovino e controle negativo água ultrapura.

A reação de sequenciamento com os primers DF e DR citados por Albuquerque et al. (2017) e o kit de sequenciamento Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a eletroforese capilar foi utilizado um analisador de genes 3130 e o polímero POP-7 (PLATT et al., 2007). O alinhamento das sequências com o software Seaview4 (Gouy et al., 2010). As sequências utilizadas no dataset foram obtidas no GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Análise filogenética com o software Seaview4, método Bio Neighbor-Joining e modelo Jukes and Cantor com bootstrap de 1.000 repetições. Visualizada no FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>), incluindo sequências disponíveis no Genbank,

Resultados

Os indicadores de produção de leite de cabra/dia destinados para as usinas de beneficiamento demonstram uma produção média no pico da lactação de 5.327 litros, com uma média por produtor de 29,9 litros. Assim, considerando a alta produção diária estadual que ficou em uma média de 14.000 mil litros de leite de cabra, a distribuição do leite de cabras para programas do governo (Paraíba, 2015; IBGE, 2019)

Os resultados obtidos para a detecção de DNA de MAP por meio da qPCR foi, uma amostra de unidade de produção testou positiva no teste molecular (1/179). As amostras de tanques coletivos e de leite após o processo de pasteurização resultaram negativas. Por meio dos dados cadastrais disponibilizados pelas unidades de beneficiamento, a unidade de produção que apresentou o resultado positivo foi rastreada, e das nove cabras em lactação na propriedade, sete apresentaram DNA de MAP no leite (77,77%).

No BLAST tool <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, a sequência mostrou identidade de aproximadamente 99% com KJ173784 no BLAST Tool e com outras sequências também como demonstra a Figura 2.

Discussão

Das amostras originárias das unidades de produção, uma amostra (1/179) apresentou material genético (DNA) de MAP por meio do teste molecular. As amostras dessas unidades de produção representam o conjunto do leite de todas as cabras em lactação, de um mesmo produtor. Assim, foi possível rastrear de qual fazenda a amostra era originária, o que permitiu a realização de testes nos animais individualmente, sendo coletadas amostras de leite de nove cabras e detectado DNA de MAP em sete delas (77,77%), por meio da PCR.

Esse tipo de vigilância é importante em programas de controle e/ou prevenção, pois permite o rastreamento de possíveis focos a partir de amostras de leite coletadas em laticínios ou postos de refrigeração. Assim, o uso da PCR para detecção de focos de MAP a partir do leite de cabras apresenta como vantagens: serem amostras obtidas de forma não invasiva, rapidez nos resultados quando comparado à técnica de cultura (Sukumar et al., 2014; Bauman et al., 2019).

Por outro lado, algumas pesquisas têm demonstrado resultados conflitantes quanto à sensibilidade da PCR para detecção de MAP no leite de cabras. Bauman et al. (2019), por exemplo, avaliaram a PCR em amostras coletadas diretamente de tanques a granel e observaram sensibilidade de 0,0% em rebanhos de cabras leiteiras no Canadá, e sugeriram que o teste de ELISA modificado teria melhor desempenho para uso em unidades de processamento e programas de controle. Favila-Humara et al. (2010) demonstraram que a PCR apresentou uma alta sensibilidade ao detectar MAP em amostras tanque à granel de três rebanhos caprinos soropositivos para MAP.

A baixa detecção da PCR no leite de cabras pode ser relacionada à fatores como a pequena quantidade de MAP eliminada e a intermitência de excreção em animais assintomáticos (Nebbia et al., 2006; Galiero et al., 2017; Bauman et al., 2019; Singh et al., 2019). Em contrapartida, amostras falso-positivas também podem ser observadas, principalmente em fazendas onde o manejo é deficitário e o grau de tecnificação é baixo, devido a possibilidade de contaminação ascendente pelo canal dos tetos, onde o leite estaria contaminado por MAP originário do ambiente e não por uma infecção ativa do animal (Schwarz et al., 2017). Porém, na presente pesquisa, a coleta das amostras de leite de cabras individualmente na unidade de produção identificada como positiva, seguiu todos os cuidados com a higienização do úbere e dos tetos antes da coleta, o que reduz o risco de amostras contaminadas com MAP do ambiente.

Na Zona da Mata do estado de Minas Gerais, Brasil, Souza et al (2016) encontraram 1,94% de amostras positivas (9/464) e 9,76% (4/41) de propriedades com pelo menos uma amostra positiva para MAP, utilizando PCR convencional em amostras individuais de leite de cabras, provenientes de criações comerciais com no mínimo 50 animais. As características climáticas e produtivas são diferentes das encontradas na região semiárida da Paraíba, onde a presente pesquisa foi desenvolvida, o que pode ter interferido nos resultados divergentes entre os dois estudos.

Em um estudo soropidemiológico no estado da Paraíba, Freitas et al. (2015) encontraram 6,97% e 0,82% de propriedades e caprinos soropositivos, respectivamente, e observaram uma associação significativa entre a ausência de tecnificação e a soropositividade no teste de ELISA. Assim, é possível que falhas

sistemáticas de manejo e ausência de um programa de vigilância que tenha como alvo a paratuberculose estejam contribuindo para a manutenção do MAP em propriedades da região estudada, onde uma pesquisa anterior já havia identificado altas frequências de caprinos e propriedades positivos em testes sorológicos usando o ELISA (Medeiros et al., 2012).

O teste realizado com amostras de tanques coletivos resultou negativo, mesmo com a mistura do leite de todas as unidades de produção, incluindo a amostra da propriedade positiva. A baixa sensibilidade da PCR em tanques coletivos foi relatada por Bauman et al. (2019), assim é possível que a mistura do leite de cabras de todas as propriedades tenha diluído a quantidade de MAP a um nível não detectável pelo teste. Esse fato sugere, portanto, que a sensibilidade da PCR pode ser melhorada, caso as amostras sejam do conjunto de leite de animais de uma mesma propriedade, quando comparada ao tanque coletivo.

Conforme verificado na análise filogenética (Fig. 2), a caracterização da sequência de nucleotídeos do DNA de MAP detectado na amostra positiva apresenta 99% de similaridade com estirpes identificadas em bovinos. Os caprinos têm se mostrado susceptíveis às três estirpes de MAP descritas até o momento: o tipo “S” (Sheep), o tipo “C” (Cattle) e o “Bison type” (Kumar et al., 2008; Favila-Humara et al., 2010; Souza et al., 2016; Galiero et al., 2017; Singh et al., 2019).

No Brasil, Souza et al. (2016) relataram o isolamento da estirpe tipo “C” de MAP em cabras leiteiras da Zona da Mata de Minas Gerais. Essa estirpe tem sido isolada de uma variedade de hospedeiros domésticos e selvagens, incluindo não ruminantes, porém é o tipo predominante em bovinos (Dimareli-Malli et al., 2013; Stevenson, 2015). A criação consorciada entre caprinos e bovinos, é comum na região estudada (Freitas et al., 2015), o que pode favorecer a circulação e manutenção do tipo “C” de MAP entre essas duas espécies de hospedeiros, situação que pode explicar a similaridade observada entre a estirpe encontrada em leite de cabras e outras detectadas em amostras originárias de bovinos (Fig. 1). Portanto, esse fato também deve ser considerado no momento do diagnóstico e na implantação de medidas de controle da paratuberculose em caprinos (Souza et al., 2016).

Conclusão

Constatou-se pela primeira vez a presença do *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* no leite de cabra na região semiárida, o que pode revelar potencial risco biológico ao homem e implicando na necessidade de vigilância ativa do agente.

Reconhecimento

Os autores gostariam de agradecer ao Grupo de Pesquisa em Doenças Transmissíveis da Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, Brasil.

Declaração dos Direitos dos Animais

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) sob o número de protocolo CEUA / CSTR n. 099/2019.

Declaração de conflito de interesse

Não há conflitos de interesse.

Referências

- Albuquerque, P.P.F et al. **Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk from the state of Pernambuco, Brazil.** *Braz. J. Microbiol.* [online]. 2017, vol.48, n.1, pp.113-117. ISSN 151382. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.010>.
- Bauman, C.A., Jones-Bitton, A., Jansen, J., Kelton, D., Menzies, P., 2019. Evaluation of bulk tank milk PCR and bulk tank milk modified ELISA tests for the detection of paratuberculosis at the herd level in goat and sheep dairies in Ontario, Canada. *J. Dairy Sci.* 102 (1), 511–520. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15020>.
- Dimareli-Malli, Z., Mazaraki, K., Stevenson, K., Tsakos, P., Zdragas, A., Giantzi, V., Petridou, E., Heron, I., Vafeas, G., 2013. Culture phenotypes and molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from small ruminants. *Res. Vet. Sci.* 95, 49–53.
- Favila-Humara, L.C., Chávez-Gris, G.G., Carrillo-Casas, E.M., Hernández-Castro, R. 2010. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in individual and bulk tank milk samples from bovine herds and caprine flocks. *Foodborne Pathog Dis.* 7(4):351-5. doi: 10.1089/fpd.2009.0374.
- Freitas, T.D., Azevedo, S.S., Silva, M.L.C.R., Garino-Júnior, F., Santos, C.S.A.B., Clementino, I.J., Amaral, F.R., Alves, C.J., 2015. Epidemiological characterization and risk factors associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy goats in the Brazilian semiarid region. *Semina. Ciências Agrárias.* 36 (1), 267–276. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n1p267>.
- Galiero, A., Turchi, B., Pedonese, F., Nuvoloni, R., Cantile, C., Colombani, G., Forzan, M., Cerri, D., Bandecchi, P., Fratini, F., 2017. Serological, culture and molecular survey of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in a goat flock in Tuscany. *Folia Microbiol.* 62 (6), 471–477. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0518-7>.
- Gouy, M. et al. **SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building.** *Mol. Biol. and Evol.* 27, 221–224. 2010. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Haenlein, G.F.W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v.51, n.1, p.155-163, 2004.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Censo agropecuário: resultados definitivos 2017. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html. Acesso em: 8 dez 2020.
- Kumar, S., Singh, S.V., Sevilla, I., Singh, A.V., Whittington, R.J., Juste, R.A., Sharma, G., Singh, P.K., Sohal, J.S., 2008. Lacto-prevalence, genotyping of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and evaluation of three diagnostic tests in milk of naturally infected goatherds. *Small Rumin. Res.* 74 (1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.03.005>.
- Lombard, J. E. 2011. Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27:525–535.

- Medeiros, J.M.A., Garino Junior, F., Almeida, A.P., Lucena, E.A., Riet-Correa, F., 2012. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Estado da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 32 (2):111-115. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000200003>.
- Nebbia, P., Robino, P., Zoppi, S., Meneghi, D., 2006. Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Rumin. Res.* 66 (1–3), 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.049>.
- OIE, 2018. World Organization for Animal Health. Available from <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.15_PARATB.pdf> Acesso em: 16 Fev 2020.
- Paraíba. Agricultores familiares com pertinência ao programa leite da paraíba em setembro de 2015. 2015. Disponível em: <<http://paraiba.pb.gov.br/desenvolvimento-humano/fornecedores-paa-leite/>> Acesso em: 18 ago 2015.
- Patel, A.; Shah, N. 2011. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* - incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 44:473–479
- Platt, A.R. et al. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques.* 43, 58–62. 2007. <http://dx.doi.org/10.2144/000112499>
- Rathnaiah, G., Zinniel, D.K., Bannantine, J.P., Stabel, J.P., Gröhn, Y.T., Collins, M., Barletta, R.G., 2017. Pathogenesis, molecular genetics, and genomics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the etiologic agent of Johne’s disease. *Front. Vet. Sci.* 4, 187. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00187>.
- Roberto, J.P.L., Limeira, C.L., Barnabé, N.N.C., Soares, R.R., Silva, M.L.C.R., Gomes, A.A.B., Higinio, S.S.S., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2021. Antibody detection and molecular analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in goat milk: Systematic review and meta-analysis. *Research in Veterinary Science*, 135: 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.01.004>.
- Sange, M. D., Becker, A., Hassan, A. A., Bulte, M., Ganter, M., Siebert, U., Abdulmawjood, A. (2019). Development and validation of a loop-mediated isothermal amplification assay-a rapid and sensitive detection tool for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in small ruminants. *Journal of Applied Microbiology*, 127(1), 47–58. <https://doi.org/10.1111/jam.14284>.
- Schwarz, D. G. G., Lima, M. C., Barros, M., Valente, F. L., Scatamburlo, T. M., Rosado, N., Moreira, M. A. S. (2017). Short communication: Passive shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in commercial dairy goats in Brazil. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 8426–8429. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12918>.
- Singh, M., Gupta, S., Chaubey, K., Singh, S., Sohal, J., 2019. Profiling of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the milk of lactating goats using antigen-antibody based assays. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 64, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.02.006>
- Souza, M.C.C., Lima, M.C., Braga, I.F.E., Schwarz, D.G.G., Rodrigues, A.N.S., Sales, E.B., Junior, A.N.F., Moreira, A.M.S., 2016. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) isolated from dairy goats in Brazil. *Small Rumin. Res.* 140, 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.009>.

Stevenson, K., 2015. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. *Vet. Res.* 46(1): 64. Doi: 10.1186 / s13567-015-0203-2.

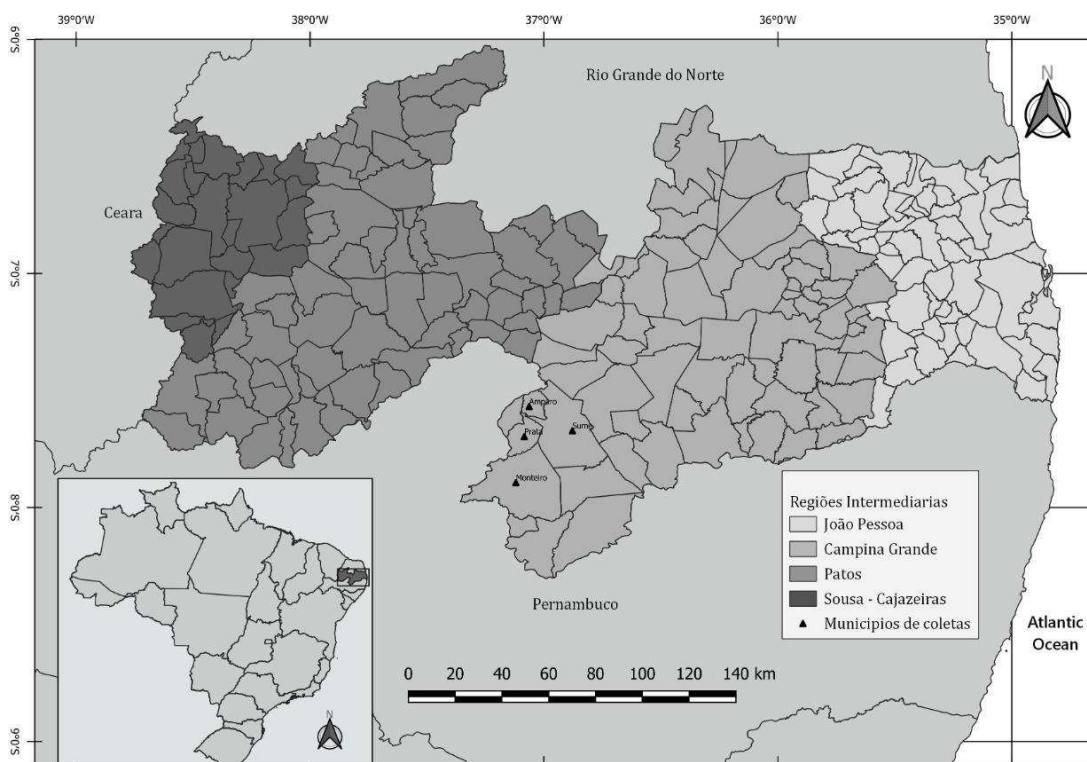
Sukumar, B., Gunaseelan, L., Porteen, K., Prabu, K., 2014. Goat milk as a non-invasive sample for confirmation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by IS900 PCR. *J. Adv. Vet. Animal Res.* 1 (3), 136–139. <https://doi.org/10.5455/javar.2014.a25>.

Windsor, P.A., 2015. Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 181, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.019>.

Thrusfield, M., 2007: *Veterinary Epidemiology*, 3rd edn. (Blackwell Science, Ed.). Oxford.

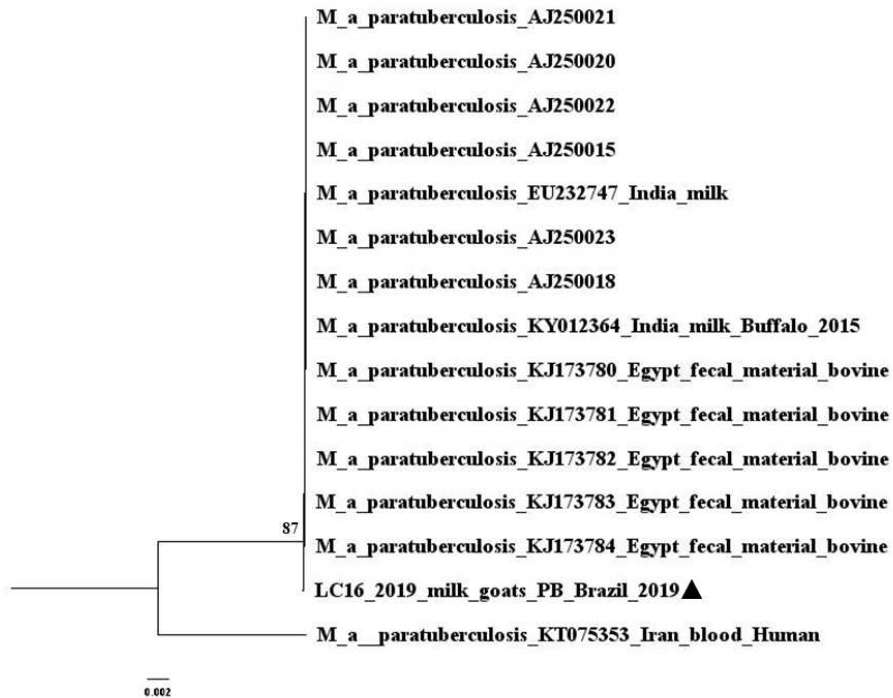
Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição geográfica dos municípios com usinas de beneficiamento de leite de cabra onde foram coletadas amostras de tanques individuais das unidades de produção para detecção molecular de MAP no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.



Fonte: Criado pelo autor.

Figura 2. Árvore filogenética do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) estabelecidas pelo método de máxima verossimilhança onde sequência mostrou identidade de aproximadamente 99% com KJ173784 no BLAST, oriunda de uma Unidade de Produção da região intermediária de Campina Grande, Paraíba, Brasil.



Fonte: Criado pelo autor.

CAPITULO III: Achados clínicos, histopatológicos e moleculares do *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) em cabras leiteiras em condições semiáridas

Artigo submetido ao Periódico Reseach in Veterinary Science (Qualis A1).

Achados clínicos, histopatológicos e moleculares de *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) em cabras leiteiras em condições semiáridas

João Paulo de Lacerda Roberto¹, Clécio Henrique Limeira¹, João Pessoa Araújo Júnior²; Camila Dantas Malossi²; Leila Sabrina Ullmann²; Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva¹; Antônio Flavio de Medeiros Dantas¹; Maria Jussara Rodrigues do Nascimento; Sergio Santos de Azevedo¹; Clebert José Alves^{1*}

Resumo: O objetivo deste trabalho foi relatar a ocorrência de *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) em cabras leiteiras, através da descrição do quadro clínico, achados histopatológicos e da caracterização molecular do agente. Foi realizada uma triagem pela técnica de PCR em tempo real em amostras de leite de 179 propriedades rurais da região. Amostras submetidas ao diagnóstico molecular foram pools de leite de todas as cabras em lactação em usinas de beneficiamento. Uma propriedade apresentou resultado positivo na qPCR. A unidade produtora que teve a amostra positiva para MAP foi localizada, sendo realizada uma visita in loco a essa propriedade e coletadas amostras individuais de 9 cabras em lactação, encontrando-se 7 amostras positivas. Em comum acordo com o proprietário, duas cabras (Animal 1 positivo e Animal 2 negativo no primeiro teste de qPCR para MAP) foram adquiridas e encaminhadas para eutanásia. Os animais 1 e 2 tiveram o leite e porções do duodeno, íleo, colón e linfonodos mesentéricos positivos para qPCR de MAP. O animal 1 ainda teve detectado o DNA de MAP em porção do jejuno e ceco. O animal 2 foi positivo na porção da válvula ileocecal. Não foi detectado MAP no sangue e fezes de ambos os animais. O MAP foi confirmado pela associação dos achados clínicos, histopatológico e qPCR. Os genes das amostras positivas foram sequenciados e demonstraram 99% de similaridade com MAP. Constatou-se pela primeira vez a presença do *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* no leite e tecidos de cabras na região semiárida.

Palavras-chave: Cabras, leite, MAP, unidades de produção, semiárido.

Abstract: The objective of this study was to report the occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in dairy goats, via description of their clinical presentation, histopathological findings, and molecular identification of the infectious agent. Triage was performed using real-time PCR in milk samples from 179 properties in the region. Samples submitted for molecular diagnosis were pooled milk from all lactating goats from

processing plants. One property had a positive result on qPCR. The production unit which had the positive sample for MAP was located, and an on-site visit to this property was performed to collect individual samples from 9 lactating goats; 7 samples tested positive. With permission from the owner, two goats (Animal 1 was positive and Animal 2 was negative on first qPCR for MAP) were acquired and euthanized. Animals 1 and 2 had milk and portions of the duodenum, ileum, colon, and mesenteric lymph nodes test positive on qPCR for MAP. Animal 1 also had MAP DNA detected in part of the jejunum and cecum. In animal 2, the ileocecal valve tested positive. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* was not detected in the blood or feces of either animal. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* was confirmed via the association of clinical findings, histopathology, and qPCR. Genes from the positive samples were sequenced and showed a 99% similarity with MAP. The presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* was identified for the first time in the goat milk and tissues in the semiarid region.

Palavras chave: Cabra, leite, MAP, unidade de produção, semiárido.

Introdução

A caprinocultura na região do Nordeste brasileiro é uma atividade de grande importância social, cultural e econômica, sendo desenvolvida sobretudo por médios e pequenos produtores (IBGE, 2019; Carvalho, 2011). A criação de cabras no Brasil aumentou significativamente nas últimas décadas, principalmente na região Nordeste, que concentra cerca de 93% (8,6 milhões de cabeças) do efetivo caprino do país.

Dentre as patologias que ameaçam o desenvolvimento da cadeia produtiva de leite destaca-se a paratuberculose ou doença de Johne, caracterizada por enterite granulomatosa crônica e infecciosa, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP), um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), que se replica nos macrófagos da lâmina própria do intestino delgado e grosso e de lento crescimento em meios de cultura (Tiwari et al., 2006; Rathnaiah et al., 2017).

Essa linfadenite granulomatosa crônica causa no animal uma absorção deficiente de nutrientes, perda de peso, diarreia e morte. As principais vias de eliminação do agente são as fezes e leite, que contaminam os pastos, instalações e utensílios de ordenha (OIE, 2018; Janagma et al., 2011). O diagnóstico em caprinos assintomáticos, para fins de estudos epidemiológicos e de vigilância ativa, requer o uso de técnicas sorológicas ou moleculares em amostras de sangue e/ou leite (Roberto et al., 2021).

A possível relação do MAP com a doença de Crohn em humanos tem gerado preocupação entre pesquisadores, principalmente quando se associa o fato de que o agente etiológico é resistente a alguns processos utilizados na indústria de laticínios e que pode haver excreção de alta carga bacteriana de MAP pelo leite, acarretando risco de contaminação para os consumidores (Windsor, 2015; Chaubey et al., 2017; Singh et al., 2019).

Apesar de escassos (Roberto et al., 2021), estudos sobre a paratuberculose em caprinos no Brasil já relataram a ocorrência da doença em rebanhos de cabras leiteiras de algumas regiões do país. No estado de Minas Gerais, Sudeste do país, Souza et al. (2016) encontraram 1,94% de amostras positivas para MAP por meio de PCR em amostras de leite de cabras de rebanhos comerciais. No estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, foram encontradas soroprevalências de 0,82% e 22,91% com a utilização do ELISA em amostras de soro sanguíneo de caprinos (Medeiros et al., 2012; Freitas et al., 2015). No entanto, não há relatos de diagnóstico definitivo da infecção em animais com sintomatologia clínica em caprinos do semiárido do Nordeste do Brasil.

Dessa maneira, o objetivo do presente estudo foi relatar pela primeira vez na região semiárida do Nordeste brasileiro os achados clínicos, histopatológicos e moleculares da infecção por MAP em cabras leiteiras em condições semiáridas.

Material e métodos

Ética

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) sob número de protocolo CEUA/CSTR N° 099/2019.

Triagem de propriedades rurais e avaliação clínica dos animais

Foi realizada uma triagem pela técnica de PCR em tempo real em amostras de leite de 179 propriedades rurais da região intermediária de Campina Grande, estado da Paraíba, semiárido do Nordeste brasileiro (Figura 1). As amostras submetidas ao diagnóstico molecular foram pools de leite de todas as cabras em lactação em usinas de beneficiamento. Uma propriedade apresentou resultado positivo na qPCR, e em seguida foi realizada uma visita in loco a essa propriedade para uma investigação epidemiológica mais apurada.

Durante a visita realizou-se avaliação clínica em nove cabras produtoras de leite presentes na propriedade, sendo verificada a condição clínica dos animais. Na sequência,

foram colhidas amostras de leite individual para detecção molecular de MAP por qPCR, com resultado positivo em nove (81,8%) animais. Em comum acordo com o proprietário, duas cabras, uma positiva e outra negativa na qPCR foram adquiridas e encaminhadas para eutanásia utilizando-se sedação prévia com cloridrato de xilazina (Bayer, Rompun[®], São Paulo, SP, Brasil) na dose de 0,2 mg/kg endovenoso, seguido da aplicação de tiopental sódico (Cristália, Thiopentax[®], São Paulo, SP, Brasil) na dose de 10mg/kg endovenoso e, após confirmação de inconsciência, aplicado o cloreto de potássio (Synth, Cloreto de Potássio P.A.-A.C.S[®], Diadema, SP, Brasil) na dose de 100mg/kg via endovenosa, conforme recomendado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

Coleta de material biológico e análise histopatológica

Antes da realização da eutanásia, amostras de leite foram coletadas após rigorosa higiene do úbere e seco com papel toalha. Os três primeiros jatos de leite foram descartados e 50 mL foram coletados em um tubo Falcon livre de DNA.

Durante a avaliação macroscópica foi realizada a coleta de fragmentos de aproximadamente 2 cm² em duplicata, de forma asséptica, de porções do intestino (duodeno, jejuno, íleo, válvula ileocecal, ceco e colón) e de linfonodos mesentéricos, para realização de exames histopatológicos e qPCR além de sangue e fezes para qPCR. Parte do material foi fixada em formalina tamponada a 10%, e posteriormente clivada e encaminhada para o processamento histológico. Este processamento consistiu em desidratação, clarificação e impregnação pela parafina. Os cortes histológicos de 4µm foram posteriormente corados pela Hematoxilina e Eosina (HE). A outra parte do material foi armazenada a -20°C até a realização da extração do DNA de todos os tecidos.

Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes

Para a coloração de Ziehl-Neelsen, as seções de tecido foram desparafinizadas e hidratadas por três lavagens em xileno por 5 minutos cada, duas lavagens em etanol 100% por 1 minuto cada, duas lavagens em etanol 95% por 1 minuto cada, e uma lavagem em água destilada por 5 minutos. As seções de tecido foram coradas durante 1 hora com TB carbol fucsina Ziehl-Neelsen ácido-resistente (Becton Dickinson, Sparks, MD). As seções foram lavadas durante 2 minutos em água corrente, descoloradas em duas breves lavagens de álcool ácido (ácido clorídrico a 1% em etanol a 70%), lavadas durante 2 minutos em água corrente e brevemente contra coradas com azul de metileno. As seções foram desidratadas por duas

lavagens breves em etanol 95%, duas lavagens breves em etanol 100% e duas lavagens breves em xileno antes de serem cobertas com uma lamínula. (Whitlock et al., 1999).

PCR em tempo real (qPCR) para detecção de MAP

A extração do material genético das amostras de sangue, leite, fezes, duodeno, jejuno, íleo, válvula ileocecal, ceco, colón e linfonodos mesentéricos foi realizado com o Kit Dneasy Blood and Tissue (Qiagen®, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi realizada como descrito por Albuquerque et al. (2017), utilizando-se os primers específicos da região IS900 do MAP, DF – 5' -GACGACTCGACCGCTAATTG-3' e DR – 5' -CCGTAACCGTCATTGTCCAG-3'. Como controle positivo foi utilizado uma cultura de *M. paratuberculosis* isolada de bovino e controle negativo água ultrapura. Amplificando um produto de 99 pb com objetivo de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada como descrito por Albuquerque et al. (2017), utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a eletroforese capilar foi utilizado um analisador de genes 3130 e o polímero POP-7 (Platt et al., 2007). O alinhamento das sequências foi feito com o software Seaview4 (Gouy et al., 2010), e as sequências utilizadas no dataset foram obtidas no GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A análise filogenética foi obtida através do software Seaview4, método Bio Neighbor-Joining e modelo Jukes and Cantor com bootstrap de 1.000 repetições, e visualizada no FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>), incluindo sequências disponíveis no Genbank.

Resultados

Na avaliação clínica foi observado que as duas cabras apresentavam escore corporal 1 onde observa-se proeminência do processo espinhoso, sem cobertura de gordura e as apófises transversas são agudas e seus extremos são palpáveis (Souza et al., 2011) e também os pelos eriçados (Figura 2; animal 1), além de mucosas oral e ocular pálidas ou avermelhada. No exame post-mortem, as lesões macroscópicas no animal 1 foram espessamento e enrugamento moderado e difuso da mucosa do jejuno, íleo, válvula ileocecal e ceco (Figura 3), e mucosa do jejuno com palidez discreta. Os linfonodos mesentéricos estavam discretamente aumentados de tamanho com superfície de corte difusamente pálida e perda da distinção corticomedular associada a áreas multifocais esbranquiçadas. O animal 2 apresentou espessamento, enrugamento e avermelhamento moderado e difuso da mucosa do jejuno (Figura 4). As

mucosas do íleo, válvula ileocecal e ceco estavam difusamente avermelhadas. Os linfonodos mesentéricos apresentavam-se aumentados de tamanho e edemaciados. Ao corte fluíu conteúdo purulento e a região cortical estava irregular com áreas multifocais esbranquiçadas. Em um dos linfonodos, havia um nódulo focal encapsulado protuso preenchido por material amarelado friável.

Microscopicamente, nos dois animais, no intestino havia enterite eosinofílica e mononuclear moderada a acentuada e difusa e nos linfonodos mesentéricos havia histiocitose acentuada e difusa nos seios medulares. Adicionalmente, no animal 1, havia piogranulomas multifocais e acentuados na submucosa do intestino e no linfonodo. Observou-se na mucosa do ceco e cólon (Figura 5) dos animais 1 e 2, e no jejuno do animal 2, moderado a acentuado infiltrado inflamatório constituído de eosinófilos, linfócitos e plasmócitos na lâmina própria da mucosa. Na submucosa de ceco e cólon do animal 1 visualizou-se áreas multifocais com piogranulomas caracterizados por centro necrótico com neutrófilos, rodeado por acentuado infiltrado inflamatório constituído de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, eosinófilos e ocasionais células gigantes multinucleadas, envolto por uma fina cápsula de tecido conjuntivo fibroso.

A Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (técnica de Ziehl-Neelsen) revelou que as amostras foram negativas.

Na qPCR e PCR para MAP, o animal 1 apresentou resultado positivo nas amostras de leite, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e linfonodos mesentéricos; no animal 2 as amostras de leite, duodeno, íleo, válvula ileocecal, cólon e linfonodos mesentéricos foram positivas na qPCR e PCR para MAP. Duas amostras positivas de duodeno foram sequenciadas e no BLAST tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) a sequência mostrou identidade genética de aproximadamente 99% com outras sequências de MAP disponíveis no Genbank (Figura 6).

Discussão

Nos caprinos e ovinos, a principal manifestação clínica da paratuberculose é o emagrecimento progressivo, mas ao contrário do que ocorre em bovinos, a diarreia em caprinos é observada raramente (Stehman, 1996; Oliveira et al., 2010). Na abordagem clínica realizada nas duas cabras deste estudo, observou-se perda acentuada de peso, sem a presença de diarreia, embora o proprietário tenha relatado histórico de diarreia no rebanho.

As principais lesões macroscópicas da paratuberculose geralmente se limitam a íleo, intestino grosso e gânglios linfáticos, sendo a válvula ileocecal considerada o sítio mais comum (Medeiros et al., 2012; Uzal et al., 2016). Em ovinos e caprinos, lesões entéricas são

mais esporádicas e sutis comparadas aos bovinos e aparecem mais comumente no jejuno distal e podem variar de lesões discretas focais ou multifocais a espessamento acentuado e difuso com enrugamentos transversais da mucosa e aderências do mesentério (Uzal et al., 2016), condição semelhante ao que foi observado nos dois animais deste estudo, corroborando os achados de cinco ovelhas infectadas naturalmente que apresentaram as mesmas características de espessamento das vilosidades, constituídos principalmente por macrófagos, linfócitos e raros granulócitos (Rocca et al., 2010).

Medeiros et al. (2012) relatou em exames histopatológicos realizados em caprinos e ovinos de municípios da região intermediária de Campina Grande e região intermediária de Patos, semiárido do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, espessamento da mucosa devido ao acúmulo de macrófagos, associado a células epitelioides, células gigantes, linfócitos e ocasionalmente neutrófilos e eosinófilos, bem como edema na mucosa e submucosa, achados que corroboram os relatos descritos na presente pesquisa. No entanto, cabe destacar que naquele trabalho não foi realizado diagnóstico molecular da infecção por MAP.

O aumento dos linfonodos ileocecais e mesentéricos foram descritos por Clarke and Little (1996), que também relatou a palidez e emaciação em ovinos. Os animais apresentavam a serosa espessada, enrugada com aspecto cerebroide, semelhante ao visto em bovinos no estudo realizado em vaca positivas para a paratuberculose em um rebanho no estado do Rio de Janeiro (Yamasaki et al., 2010)

Nos linfonodos dos animais 1 e 2 foi encontrada acentuada quantidade de macrófagos ocupando os seios medulares. Nos estágios iniciais da infecção por MAP, há aumento no número de macrófagos dentro do seio subcapsular e, com o tempo, estes progridem para infiltrados nodulares ou difusos de macrófagos epitelioides e células gigantes que substituem grande parte do córtex linfonodal e se infiltram nos seios medulares (Clarke and Little, 1996).

Os microrganismos localizados nos citoplasmas de macrófagos e células gigantes multinucleadas são facilmente visualizados através da coloração especial Ziehl-Neelsen (Uzal et al., 2016), entretanto, não foram observadas bactérias álcool-ácido resistentes nos fragmentos de intestino e linfonodos submetidos a esta coloração provenientes dos animais 1 e 2, porém, no diagnóstico molecular dos tecidos das cabras 1 e 2 foram encontrados DNA do MAP no ceco. Rocca et al, (2010) detectaram MAP em amostras de íleo e ceco de ovelhas infectadas naturalmente, no entanto, as amostras foram negativas na pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (técnica de Ziehl-Neelsen). O infiltrado de células epitelioides e linfócitos com relativamente poucos microrganismos pode representar a forma paucibacilar da doença (Uzal et al., 2016), enquanto a forma multibacilar é caracterizada por um acentuado

processo inflamatório e abundante quantidade de organismos. Portanto, sugere-se que os animais 1 e 2 deste estudo tenham desenvolvido a forma paucibacilar o que pode ter contribuído para um processo inflamatório menos acentuado.

Embora os animais deste estudo tenham sido positivos no teste molecular e apresentado algumas alterações histopatológicas semelhantes às descritas na literatura para infecção por MAP, em alguns animais podem não ser observados alterações histopatológicas, conforme verificado no estudo de Sigurdardóttir et al. (1999).

O diagnóstico de paratuberculose é difícil, especialmente nos estágios precoces da doença por causa da natureza multifocal e do lento desenvolvimento das lesões iniciais provocadas pelo MAP, tornando incerta a identificação *post-mortem* de animais convalescentes e com infecções subclínicas (Sigurdardóttir et al., 1999). Estes estágios iniciais apresentaram desafios adicionais no diagnóstico patológico, uma vez que lesões macroscópicas geralmente podem estar ausentes e a distribuição multifocal de pequenos granulomas torna a identificação histopatológica difícil (Chiodini et al., 1984; Sigurdardóttir et al., 1999). Além disso, pode haver baixo número de microrganismos (Buergelt and Ginn, 2000). Portanto, o diagnóstico subclínico preciso necessita de mais de um teste que poderia ser o sorológico (ELISA) para complementar o diagnóstico histopatológico (Hailat et al., 2011).

Durante a fase de investigação, foi possível observar que o animal 2 apresentava um quadro subclínico de MAP, e não foi possível a detecção do MAP no leite durante a coleta inicial, realizada individualmente nas cabras em lactação da unidade de produção, sendo detectado o DNA de MAP somente um mês após a visita, durante a coleta que antecedeu a eutanásia dos animais. Esse fato sugere duas possibilidades: ou esse animal foi infectado após a primeira coleta, ou está relacionado ao padrão intermitente de excreção de MAP pelo leite de cabras assintomáticas (Nebbia et al., 2006).

O MAP estar presente em regiões com diferenças edafoclimáticas marcantes, fato que pode ser mencionado a partir dos estudos de Nematí et al. (2015), no Irã, que observou em linfonodos mesentéricos de caprinos a presença de DNA de MAP. No Brasil, na região sudeste, no Estado de Minas Gerais, Schwarz et al, (2012) conseguiu através da técnica de PCR identificar a MAP em amostras de leite de cabra e no presente estudo no bioma caatinga, região semiárida do Brasil, em cabras criadas em uma região típica de produção de cabras de leite.

Analisando os dados obtidos neste trabalho, na qual se verifica a detecção do MAP em diversos seguimentos do intestino como o duodeno, jejuno, íleo válvula íleo cecal, ceco, colon

e linfonodos mesentérico, além do leite das duas cabras, foi possível constatar, que os resultados foram diferentes dos achados de Schwarz et al (2017) que trabalhando com quatro cabras sabidamente positivas, originárias de um estudo anterior (Souza et al., 2016) com 13 animais positivos. As amostras de fezes e leite das quatro cabras se revelaram negativas para MAP, além de não terem sido observados a necropsia nenhuma lesão macroscópica, histológica e na coloração de Ziehl-Neelsen, chegando à conclusão de que os animais eram derramadores passivos do MAP.

Conclusão

Constatou-se pela primeira vez a presença do *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* no leite e tecidos de cabras leiteiras na região semiárida do Nordeste brasileiro, o que revela um potencial risco biológico ao homem e implica na necessidade de vigilância ativa do agente e monitoramento das unidades de produção.

Referências

Albuquerque, P.P.F et al. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk from the state of Pernambuco, Brazil. Braz. J. Microbiol. [online]. 2017, vol.48, n.1, pp.113-117.ISSN 1517-8382. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.010>.

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.

Carvalho, R.B. 2011. Potencialidades dos Mercados para os produtos derivados de caprinos e ovinos. Disponível em <http://www.caprítec.com.br/art040521.htm> Acesso em: Setembro de 2019.

Chaubey, K.K., Singh, S.V., Gupta, S., Singh, M., Sohal, J.S., Kumar, N., Singh, M.K., Bhatia, A.K., Dhama, K., 2017. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* - an important food borne pathogen of high public health significance with special reference to India: an update. Vet. Q. 37 (1), 282–299. <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1397301>.

Chiodini R. J.; Van Kruiningen H. J. & Merkal R. S. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. Cornell Vet. v.74, p.218–262, 1984.

Clarke C.J. and Little D. 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: Gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.* 114(4):419-437.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Portaria nº 465, de 23 de maio de 2013. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA. Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226494.pdf

Freitas, T.D.; Silva, M. L.C.R.; Garino, F.J.; Azevedo, S.A.; Santos, C.S.A.B.; Clementino, I.J.; Riet-correa, F. A.; Alves, C.J. Epidemiological characterization and risk factors associated with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection in dairy goats in the Brazilian semiarid. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 36, n. 1, p. 267-276, jan./fev. 2015.

Gouy, M. et al. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. and Evol.* 27, 221–224. 2010. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msp259>

Hailat, N.; Hemida, H.; Hananeh, W.; Stabel, J.; Rezig, F. E.; Jaradat, S. & Al-Saleh, A. Investigation on the occurrence and pathology of paratuberculosis (Johne's disease) in apparently healthy cattle in Jordan. *Comparative Clinical Pathology*. v.21, p.879–888, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário : resultados definitivos 2017. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html. Acesso em: 8 dez 2020.

Janagama, H. K.; Jeong, K. il; Kapur, V.; Coussens, P.; Sreevatsan, S. Lombard, J. E. 2011. Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27:525–535.

Medeiros, J.M.A.; Junior, F.G.; Almeida, A.P.; Lucena, E.A.; Riet-Correa, F. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Estado da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(2): 111-115, 2012.

Nebbia, P.; Robino, P.; Zoppi, S.; DE Meneghi, D. Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Ruminant Research*, v.66, p.116-120, 2006.

Nemati M. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the mesenteric lymph nodes of goats by PCR and culture. *Journal of Livestock Science Technologies*. 2015;3:56–60.

Nielsen, SS, Bjerre, H, Toft, N, 2008. Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, v, 91, p, 4610- 4615.

OIE 2018. World Organization for Animal Health. Disponível em <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.15_PARATB.pdf> Acesso em 16 fev. 2019.

Oliveira D.M., Riet–Correa F., Galiza G.J.N., Assis A.C.O., Dantas A.F.M., Bandarra P.M. & Garin Jr F. 2010. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 30(1):67-72.

Platt, A.R. et al. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques*. 43, 58–62. 2007. <http://dx.doi.org/10.2144/000112499>

Rathnaiah G, Zinniel DK, Bannantine JP, Stabel JP, Gröhn YT, Collins M, et al. Pathogenesis, Molecular Genetics, and Genomics of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, the Etiologic Agent of Johne’s Disease. *Front Vet Sci*. 2017;4:187.

Roberto, J.P.L., Limeira, C.L., Barnabé, N.N.C., Soares, R.R., Silva, M.L.C.R., Gomes, A.A.B., Higino, S.S.S., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2021. Antibody detection and molecular analysis for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) in goat milk: Systematic review and meta-analysis. *Research in Veterinary Science*, 135: 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.01.004>.

Rocca, S., Cubeddu, T., Nieddu, A. M., Pirino, S., Appino, S., Antuofermo, E., ... Leoni, A. (2010). Detection of *Mycobacterium avium* spp. paratuberculosis (Map) in samples of sheep paratuberculosis (Johne's disease or JD) and human Crohn's disease (CD) using liquid phase RT-PCR, in situ RT-PCR and immunohistochemistry. *Small Ruminant Research*, 88(2-3), 126–134. doi:10.1016/j.smallrumres.2009.12.020

Schwarz, D. G. G., Lima, M. C., Barros, M., Valente, F. L., Scatamburlo, T. M., Rosado, N., Moreira, M. A. S. (2017). Short communication: Passive shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in commercial dairy goats in Brazil. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 8426–8429. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12918>

Sigurardóttir, O. G.; Press, C.M.; Saxegaard, F. & Evensen, Ø. Bacterial Isolation, Immunological 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.

Singh, Manju; Gupta, Saurabh; Chaubey, Kundan; Singh, Shoor; Sohal, Jagdip. 2019. Profiling of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in the milk of lactating goats using antigen-antibody based assays. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 64. 10.1016/j.cimid.2019.02.006.

Souza, M.C.C., Lima, M.C., Braga, I.F.E., Schwarz, D.G.G., Rodrigues, A.N.S., Sales, E.B., Junior, A.N.F., Moreira, A.M.S., 2016. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) isolated from dairy goats in Brazil. *Small Rumin. Res.* 140, 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.009>.

Stehman S.M. & Shulaw W.P. 1996. Paratuberculosis (Johne's disease) in sheep and goats: Recommendations for diagnosis and control. United States Animal Health Association Committee on Sheep and Goats.

Tiwari, A.; Vanleeuwen, J.A.; McKenna, S.L.B.; Keefe, G.P.; Barkema, H.W. Johne's disease in Canada. Part I. Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Canadian Veterinary Journal*, 47(9): 874-882, 2006.

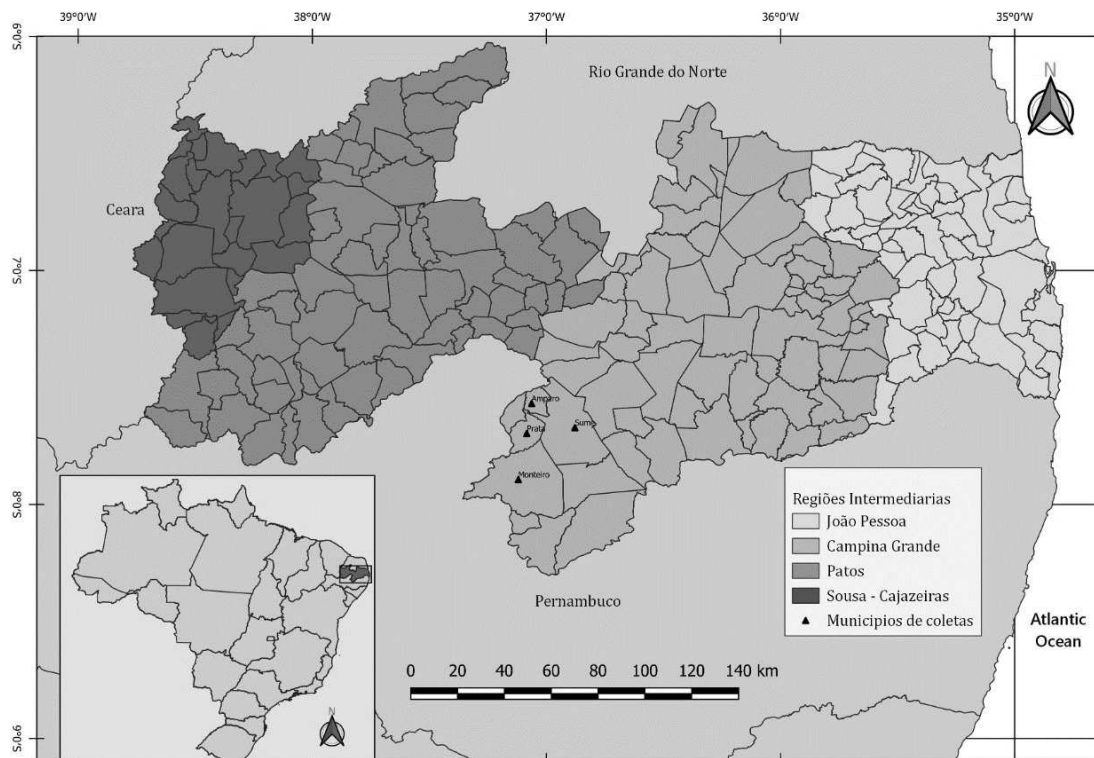
Uzal, F. A.; Plattner, L. B. & Hostetter, J. M. Alimentary System, p. 1-257. In: Jubb, K; Kennedy, P. & Palmer, N. Pathology of domestic animals. Vol.2. 6^a ed. China: Elsevier. 654 p. 2016.

Windsor, P.A., 2015. Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 181, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.019>.

Whitlock RH, West SR, Layton B, Ellingson J, Stabel J, Rossiter C, Buergelt C, Ginn P, Pavlik I, Collins MT, Juste R, Habecker P: Paratuberculosis in bison: a comparison of PCR, culture, serology, and histopathology. *Proc 6th Int Colloq Paratuberculosis* 424–438, 1999

Yamasaki, Elise M et al . Aspectos clínico-patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro , v. 30, n. 11, p. 921-932, Nov. 2010

Figura 1. Distribuição geográfica dos municípios com usinas de beneficiamento de leite de cabra onde foram coletadas amostras de tanques individuais



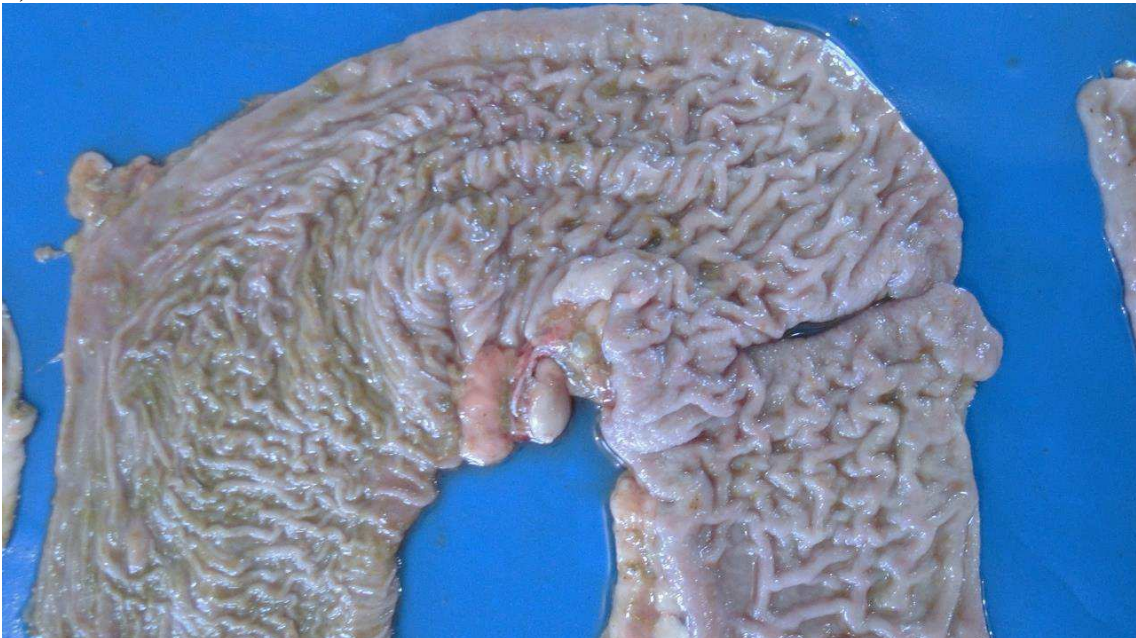
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 2. Caprino apresentando baixo escore corporal, pelos opacos e eriçados (Animal 1).



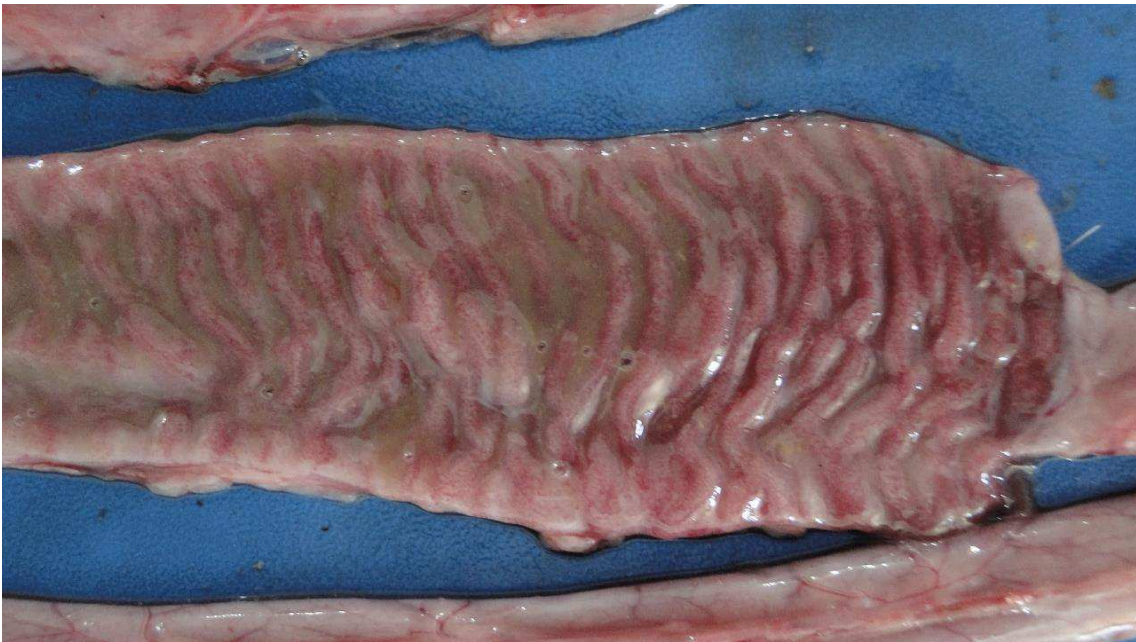
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 3. Achados macroscópicos com enrugamento moderado e difuso da mucosa do íleo e ceco, mucosa discretamente pálida e aumento do linfonodo mesentérico (Animal 1)



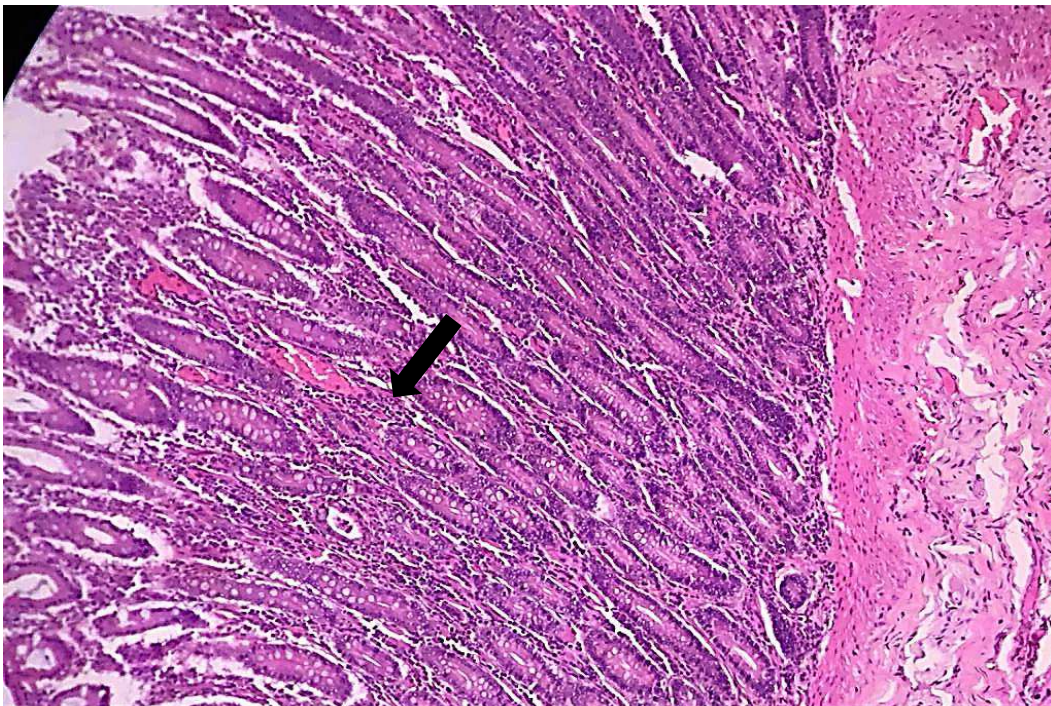
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 4. Achados macroscópicos apresentando espessamento, enrugamento e avermelhamento moderado e difuso da mucosa do jejunum (Cabra 2).



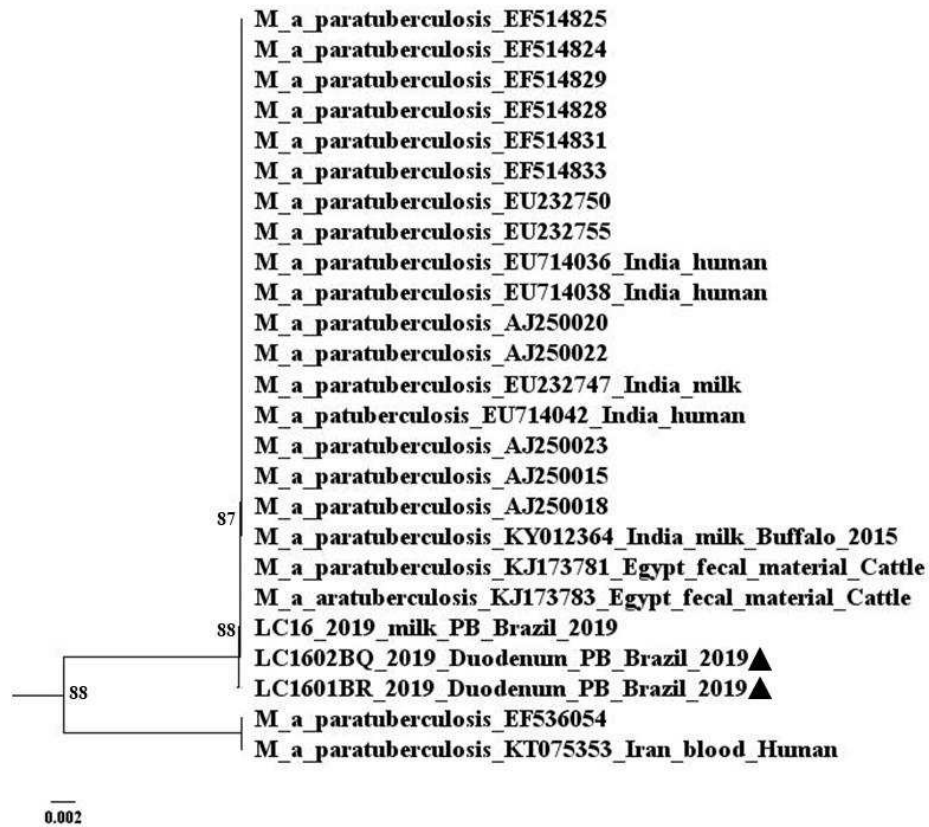
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 5. Microscopia do ceco com aumento de 10x demonstrando moderado a acentuado infiltrado inflamatório constituído de eosinófilos, linfócitos e plasmócitos na lâmina própria da mucosa (Animal 1).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 6. Árvore filogenética do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) baseada no alinhamento do fragmento do gene IS900, estabelecidas pelo método de máxima verossimilhança método Bio Neighbor-Joining e modelo Kimura 2p com bootstrap com 1.000 repetições, oriunda do duodeno de duas cabras leiteiras da região intermediária de Campina Grande, Paraíba, Brasil.



Fonte: Arquivo pessoal

CONCLUSÃO GERAL

De acordo com os resultados observados nos estudos conduzidos para composição dessa Tese conclui-se que:

Houve um número limitado de artigos sobre a presença de MAP em leite de cabra, que revela um potencial risco biológico para as pessoas e implica a necessidade de vigilância ativa do agente. Para tanto, os testes ELISA e PCR são promissores, embora ainda precisem de validação e melhorias em termos de sensibilidade / especificidade e aplicabilidade para uso rotineiro na produção cadeia de leite de cabra. Constatou-se ainda que pela primeira vez a presença do *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* no leite de cabra na região semiárida, o que revela potencial risco biológico ao homem e implica na necessidade de vigilância ativa do agente. O leite é considerado um bom material biológico para ser utilizado no diagnóstico de paratuberculose em programas de controle e vigilância que requerem quantidades consideráveis de amostras.