

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Pesquisa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
em caprinos e ovinos provenientes de matadouro na Paraíba

SORAIA VITAL JUSTINIANO

PATOS-PB

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CAMPINA GRANDE

CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL - CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Pesquisa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
em caprinos e ovinos provenientes de matadouro na Paraíba**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de
Campina Grande – UFCG em
cumprimento ao requisito
necessário para obtenção do
título de Mestre em Medicina
Veterinária.

SORAIA VITAL JUSTINIANO

Prof. Dr. Felício Garino Júnior

Orientador

PATOS-PB

CSTR - CENTRO DE PATOS - PB FICHA CATALOGRÁFICA

Dados de Acordo com AACR2, CDU e CUTTER

Biblioteca Central

Justiniano, Soraia vital.

J96p Pesquisa de *Mycobacterium avium* subsp.
Paratuberculosis em caprinos e ovinos provenientes
de matadouro na Paraíba. / Soraia Vital Justiniano. – Patos - PB, 2012.
56 f.: il. Color.

Orientador: Prof. Dr. Felício Garino Júnior
Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)
Centro de Saúde e Tecnologia Rural,
Universidade Federal de Campina grande

1. Pequenos ruminantes, 2. Matadouros, 3. PCR,
4. *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis*
(MAP).I.Título.
II. Universidade Federal de Campina grande

BC

CDU: 619

Francisco das Chagas Leite, Bibliotecário. CRB -15/0076

NOME: JUSTINIANO, Soraia Vital

Título: Pesquisa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em caprinos e ovinos provenientes de matadouro na Paraíba

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Campina Grande – UFCG em cumprimento ao requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Aprovado em _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felício Garino Junior

Orientador

Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto

(1º membro)

Prof. Dr. Albério Antonio de Barros Gomes

(2º membro)

Dedico

Aos Meus Pais e meus irmãos

AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso por ter por me oferecer a coragem de enfrentar o mestrado e concluí-lo.

A meus pais Antonio Justiniano Filho e Maria José Vital Justiniano pelo apoio incondicional, principalmente a minha mãe, pois a mesma já enfrentou essa fase e pode me mostrar o valor de uma pós-graduação.

Aos meus irmãos pelo incentivo, ajuda, compreensão e paciência.

Ao meu orientador Professor Felício Garino Junior, pela paciência, compreensão, esforço junto a mim para a realização deste sonho. Obrigado por tudo.

Aos professores: Dr. Franklin Riet-Correia, Dra. Sara Vilar Dantas Simões, Msc. Sônia Maria de Lima, Dra. Rosane Maria da Trindade Medeiros, Dr. Pedro Isídoro da Nóbrega Neto, Dr. Eldinê G. Miranda Neto, Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas, pela amizade, por compartilhar comigo conhecimentos fundamentais para minha formação profissional e principalmente pelo exemplo de profissionalismo e dedicação.

Aos amigos que me ajudaram na pesquisa Atticus Tanicawa, Gildazio Dias, Edimon Segundo, Luedja Carla.

Aos senhores diretores do matadouro da cidade de Esperança e de Patos por fornecer o acesso para coleta das amostras e assim realizar a pesquisa.

Ao professor Dr. Mateus Mattiuzi por ceder espaço no seu laboratório para a realização da pesquisa na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).- Petrolina/PE. E a Dra. Gisele Gouveia pela paciência nos ensinamentos da biologia molecular.

Por fim posso dizer que Deus me ajudou bastante... desistir? Já pensei sim...mas minha mãe sempre me ajudou e me ensinou a levantar a cabeça e concluir com fé e coragem.

SUMÁRIO

	Pág
Lista de Figuras.....	Xi
Lista de Quadros.....	Xii
Lista de siglas e abreviaturas.....	Xiii
Resumo.....	10
Abstract.....	11
Introdução.....	12
Referências.....	13
Capítulo I - Paratuberculose em pequenos ruminantes no Brasil. REVISÃO..	14
Resumo.....	15
Abstract.....	15
Desenvolvimento.....	16
Referências Bibliográficas.....	27
Capítulo II - Pesquisa de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> em caprinos e ovinos providos de matadouros na Paraíba.....	33
Abstract.....	34
Resumo.....	34
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	36
Resultados.....	38
Discussão e Conclusão.....	38
Referências Bibliográficas.....	41
Conclusões.....	47
Anexos.....	48

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Capítulo II Pesquisa de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> em caprinos e ovinos providos de matadouros na Paraíba.....	33
FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da válvula ileocecal e linfonodo de caprinos e ovinos. Pistas 2, 4, 6, 7, 9, 14, 15, 16, 17 foram amostras positivas, as pistas 1, 3, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 18: amostras negativas. P: Controle positivo com IS900 produto de peso molecular de 99 bp e o M: Marcação do peso molecular. * a= válvula ileocecal/ b=linfonodo	44

LISTA DE QUADROS

	Pág
Capítulo II	
Pesquisa de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> em caprinos e ovinos providos de matadouros na Paraíba.....	33
Quadro 1.	
Resultado da Reação em Cadeia Polimerase (PCR) de tecido (válvula ileocecal e linfonodo adjacente) de 44 ovinos machos e 33 fêmeas, providos de matadouro na Paraíba. 2012.....	45
Quadro 2.	
Resultado da Reação em Cadeia Polimerase (PCR) de tecido (válvula ileocecal e linfonodo adjacente) de 45 caprinos machos e 29 fêmeas, providos de matadouro na Paraíba. 2012.....	45
Quadro 3.	
Resultado positivo da PCR em 76 amostras de ovinos e 74 de caprinos a partir da válvula ileocecal e linfonodo em animais de 1 à 4 anos. Paraíba. 2012.....	45
Quadro 4.	
Explicação dos resultados positivos na PCR de ovinos e caprinos providos de diferentes municípios na Paraíba e demais estados. 2012.....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MAP- *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis*

BAAR – Bacilos álcool-ácido resistentes

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

IS – Sequência de inserção

PCR – Polymerase Chain Reaction

ZN- Ziehl Neelsen

ELISA – *Enzime Linked Immuno Sorbent Assay*

RESUMO

A paratuberculose é uma doença infectocontagiosa, crônica, incurável que atinge diversas espécies de animais, provocando uma enterite e linfadenite granulomatosa crônica, caracterizada por síndrome da má absorção, diarreia e perda de peso, influenciando na redução da produtividade e causando grande impacto na economia. Causada pelo *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis* (MAP), que também é considerada como o agente causador da Doença de Crohn em humanos. Esta dissertação é formada por dois artigos originais. O primeiro submetido à revista Arquivos do Instituto Biológico que faz uma explanação sobre a paratuberculose no Brasil com enfoque em caprinos e ovinos; definição, etiologia, patogenia, sinais clínicos particulares destas espécies, lesões macro e microscópicas, diagnóstico e fatores de risco associado a prevenção da doença. O segundo capítulo foi submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira abordando a ocorrência do Map em caprinos e ovinos provenientes de matadouros na Paraíba. Onde amostras de linfonodos mesentéricos e válvulas ileocecal foram coletadas de 151 animais (77 ovinos e 74 caprinos) para a realização do diagnóstico mediante o exame histopatológico utilizando as colorações de Hematoxilina e Eosina e Ziehl-Neelsen, a Reação em Cadeia Polimerase (PCR). Na histopatologia pela coloração de H&E, observaram-se inflamações inespecíficas não condizentes com lesões de paratuberculose. Não foram visualizados bacilos álcool-ácido-resistentes nas amostras, entretanto, pela a técnica da PCR, 15,6% dos ovinos estudados e 12,16% dos caprinos foram positivos para o Map.

PALAVRAS CHAVES- Pequenos ruminantes, matadouros, PCR, *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis* (MAP)

ABSTRACT

Paratuberculosis is an infectious disease, chronic, incurable that affects several species of animals, causing a chronic granulomatous enteritis and lymphadenitis, characterized by malabsorption syndrome, diarrhea and weight loss, reduced productivity in influencing and causing great impact on the economy. Caused by *Mycobacterium avium* (subsp.) paratuberculosis (Map), which is also considered as the causative agent of Crohn's disease in humans. This dissertation consists of two original articles. The first submitted to the journal Archives of Biology Institute which is an explanation of paratuberculosis in Brazil with a focus on sheep and goats; definition, etiology, pathogenesis, clinical signs of these particular species, gross and microscopic lesions, diagnosis and risk factors associated with prevention the disease. The second chapter was submitted to the journal Veterinary Research addressing the occurrence of the Map in goats and sheep from abattoirs in Paraíba. Where samples of mesenteric lymph nodes and ileocecal valves were collected from 151 animals (77 sheep and 74 goats) for the diagnosis by histopathology using hematoxylin and eosin staining and Ziehl-Neelsen, and the Polymerase Chain Reaction (PCR). In histopathology by H & E staining, there were no nonspecific inflammatory lesions consistent with paratuberculosis. There were visualized acid-fast bacilli in resistant samples, however, by the PCR technique, 15.6% studied in sheep and goats 12.16% were positive for Map.

KEY WORDS: Small ruminants, slaughterhouses, PCR, *Mycobacterium avium* (subsp.) paratuberculosis (MAP)

INTRODUÇÃO

A pecuária no nordeste brasileiro abrange rebanhos de caprinos e ovinos, o criador se preocupa com o manejo, alimentação e principalmente com as doenças susceptíveis que possam acometer essas espécies. A paratuberculose é uma doença infectocontagiosa, crônica, incurável que atinge diversas espécies de animais além de, ser considerada como uma zoonose na qual, se denomina Doença de Cronh (CLARKE C. J., 1997; WADDELL et al., 2008). É causada pelo *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis* (Map), que se multiplica no interior de macrófagos na lâmina própria da válvula-ileocecal, provocando como sinais clínicos diarreia profusa, perda de peso, caquexia e morte por inanição (RASTOGE et al., 2001; STEHMAN, 1993). Poucas pesquisas sobre essa doença são direcionadas a pequenos ruminantes, por isso este estudo buscou verificar a micobactéria em caprinos e ovinos supostamente saudáveis que são encaminhados ao matadouro público.

Esta dissertação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, é composta por dois capítulos constituídos por uma revisão bibliográfica e um artigo científico, cumprindo assim com as exigências do programa.

No primeiro capítulo realizou-se uma revisão sobre a paratuberculose em pequenos ruminantes no Brasil, relatando determinadas particularidades desta doença nessas espécies, enquanto que, o segundo capítulo aborda uma pesquisa realizada em matadouros paraibanos, investigando a ocorrência desta enfermidade em pequenos ruminantes enviados para o abate de diferentes municípios e estados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLARKE C. J. **The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other Species: A review.** J. Comp. Pathol. v.116, n. 3, p. 217-261. 1997.
- RASTOGI N, LEGRAND E, SOLA C: **The mycobactéria: an introduction to nomenclature and pathogenesis.** Rev Sci Tech, v. 20, p.21-54, 2001.
- STEHMAN, S.M. Moléstia de Johne (paratuberculose). In: SMITH, B.P.(Ed). **Tratado de Medicina Veterinária Interna de Grandes Animais:** moléstias de eqüinos, ovinos e caprinos. São Paulo: Manole, p.823-830, 1993.
- WADDELL, L.A.; RAJIĆ, A.; SARGEANT, J. et al. **The zoonotic potential of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis: a systematic review.** Can. J. Public. Health, v.99, p.145-155, 2008.

CAPÍTULO I

Paratuberculose em pequenos ruminantes no Brasil: REVISÃO

Manuscrito submetido à Revista
Arquivos do Instituto Biológico, São
Paulo (impresa – ISSN 0020-3653 e
on line – ISSN 1808-1657

Paratuberculose em pequenos ruminantes no Brasil: REVISÃO

Paratuberculosis small ruminates in Brazil: REVIEW

Justiniano S. V. ²; Garino F. J. ²;

RESUMO

A paratuberculose ou doença de Johne é uma enfermidade infectocontagiosa, provocada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), que afeta mamíferos, causando enterite e linfadenite granulomatosa crônica. É estudada principalmente em rebanhos bovinos e pouco se sabe em caprinos e ovinos. Essa doença causa altos prejuízos econômicos através da restrição da comercialização de animal vivo e contaminação da terra. O Map são bastonetes finos, aeróbios, de crescimento lento, patógeno obrigatório, Bactérias Álcool-Ácido-Resistentes (BAAR.). Em animais infectados os bacilos estão presentes no leite, colostro e fezes; seu contágio ocorre por via oral-fecal em animais abaixo de um ano, onde os bacilos irão invadir e alterar estruturalmente a mucosa do íleo e válvula ileocecal, ocasionando má absorção intestinal, que pode ser demonstrado por sinais de fraqueza muscular, perda de pêlo, emagrecimento, hipoproteinemia, edema e como consequência final a diarreia. Em caprinos e ovinos a diarreia pode estar ausente. Na patologia as lesões se concentram na região do íleo e linfonodos adjacentes, observando o engrossamento da mucosa e uma formação de pregas transversais com o aspecto das circunvoluções cerebrais, além de hipertrofia dos linfonodos. Na histopatologia descrevem-se duas formas de lesões: multibacilar e paucibacilar. Em pequenos ruminantes o diagnóstico é realizado através de exames laboratoriais como: baciloscopia, testes sorológicos (ELISA), imunohistoquímica, meios de cultivo e biologia molecular (PCR). Não há tratamento para esta doença, os animais doentes são descartados e o controle é realizado a partir do manejo, eliminando o risco da transmissão da doença entre os animais.

PALAVRAS CHAVES: Map., caprinos, ovinos

ABSTRACT

Paratuberculosis or Johne's disease is an infectious disease, caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), which affect mammals, causing a chronic granulomatous enteritis and lymphadenitis. It is studied mainly in cattle and little is known in goats and sheep. This disease causes high economic losses by restricting the marketing of live animals and soil contamination. The Map. are thin rods, aerobic, slow-growing pathogen binding, Alcohol-acid-resistant (BAAR.). In animals infected with the bacilli are present in milk, colostrum, and faeces; its contagion occurs through fecal-oral route in animals under one year, where the bacilli will invade and structurally changing the lining of the ileum and ileocecal valve, causing intestinal malabsorption, which can be demonstrated by signs of muscle weakness, hair loss, weight loss, hypoproteinemia, edema and diarrhea as a final consequence. In goats and sheep diarrhea may be absent. In

pathology lesions are concentrated in the region of the ileum and adjacent lymph nodes, noting the thickening of the mucosa and formation of transverse folds with the appearance of the cerebral, and hypertrophy of the lymph nodes. Histopathology describes two forms of injury: multibacillary and paucibacillary. In small ruminants the diagnosis is made by laboratory tests such as smear, solológicos tests (ELISA), culture media, molecular biology (PCR), etc. There is no treatment for this disease, sick animals are discarded and control is performed from the management, eliminating the risk of disease transmission between animals.

KEY WORDS: Map., sheep, goats.

A paratuberculose ou doença de Johne é uma enfermidade infectocontagiosa crônica, incurável, de distribuição mundial, que atinge mamíferos com particular relevância, pequenos e grandes ruminantes, equinos, suínos, lhama, búfalo, camelo e animais silvestres; causando enterite e linfadenite granulomatosa crônica, provocando uma má absorção dos nutrientes e conseqüentemente quadros de emagrecimento, caquexia e diarreia (CLARKE, 1997, HARRIS; BARLETTA, 2001, RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007, TEIXEIRA; SIMÕES, 2008).

Essa doença influencia na redução da produtividade dos animais provocando perdas na comercialização de produtos alimentícios, causando altos prejuízos econômicos através da venda prematura de animais, diminuição na produção leiteira, aumento nos casos de mastite, alterações reprodutivas como maior intervalo entre partos, redução do valor do animal e restrição na sua comercialização, redução do valor do leite; além de outros custos como assistência veterinária, exames, medicamentos (MENZIES, 2010; RADOSTITS et al., 2007). Nos EUA, os prejuízos econômicos relacionados com a enfermidade em bovinos, na década de 90, ficou estimado na ordem de 200 a 250 milhões de dólares por ano (OTT et al, 1999)

A relevância da paratuberculose na saúde pública deve-se ao seu possível potencial zoonótico relacionado com a Doença de Crohn (CD) em pacientes

humanos (WADDELL et al., 2008), que consiste em uma doença inflamatória crônica no intestino delgado. A relação de causalidade entre o Map e a CD ainda esta sendo estudada (CHIODINI;ROSSITER, 1996; EUROPEAN, 2000), entretanto, este agente foi detectado no leite cru e pasteurizado de vacas, ovelhas e cabras infectadas e queijos em diferentes países, além de ter sido diagnosticado no masseter e no músculo do diafragma de carcaças bovinas (ALONSO-HEARN et al, 2009; OKURA et al, 2011). Este fato sugere que os seres humanos podem ser potencialmente expostos a este agente pelo consumo de produtos lácteos e cárneos (CHIODINI et al. 1984; MILLAR et al, 1996, ALONSO-HEARN et al, 2009; OKURA et al, 2011).

No Brasil existem poucos grupos de pesquisa no assunto, sendo estudada principalmente em rebanhos bovinos, pois estes animais apresentam uma sintomatologia clinica mais consistente com a doença e o prejuízo econômico com o descarte é muito maior, porém, em muitas regiões brasileiras a criação pecuária, consiste em rebanhos de ovinos e caprinos; com o surgimento de novos casos tornou-se necessário um maior conhecimento sobre esta doença nessas espécies. Esta revisão foi desenvolvida com o objetivo de esclarecer particularidades sobre a paratuberculose em pequenos ruminantes.

Descoberta em 1895, por Dr Heirich Albert Johne e pelo Dr. L. Frothingham, em Massachusetts (EUA), os quais batizaram a doença inicialmente como enterite pseudotuberculosa, pois, consideram o agente como um tipo de bacilo que se assemelhava ao aviário, uma forma especial de tuberculose. Mas, somente em 1900, Dr. Bernard Bang, na Dinamarca, avaliou criticamente a doença, reconhecendo que, embora fosse semelhante à tuberculose intestinal, ela era uma

bactéria diferente, propondo o nome de *paratuberculose* (CARTER, 1988; SILVA, 1968, GOMES, 2011).

No Brasil, em 1915, Dupont, diagnosticou o primeiro caso de paratuberculose em bovinos importados no estado do Rio de Janeiro. Mais tarde a enfermidade foi descrita em varias regiões como nos Estados do Rio de Janeiro (Santos & Silva, 1956, Darcoso Filho et al, 1960, Ferreira et al. 2001), Rio Grande do Sul (Ramos et al. 1986, Driemeier et al. 1999, Gomes et al. 2002), Santa Catarina (Portugal et al. 1979), Minas Gerais (Nakajima et al. 1991, Carvalho et al, 2008), São Paulo (Brautingam et al. 1996, Fonseca et al. 2000), Mato Grosso do Sul (Brautingam et al. 1996, Oliveira et al. 2008), Paraíba (Dias et al. 2002), Goiás (Acypreste et al. 2005), Pará (Silva 2005) e Pernambuco (Mota et al. 2007). Casos de paratuberculose em Bubalinos foram relatadas por Mota e colaboradores em 2010 no Pernambuco. No Brasil as pesquisas sobre a doença ainda estão evoluindo e o seu impacto econômico ainda não foi mensurado (GOMES et al, 2002).

Apesar do aumento das pesquisas sobre a paratuberculose no Brasil, a prevalência desta doença no país, relacionado a bovinos, ainda não possui dados consistentes porém, sabe-se que no estado de São Paulo a prevalência foi de 38% (LARANJA DA FONCESCA, 1999), no Rio de Janeiro 30% (RISTOW et al, 2007) , em Goiânia 60,24 (ACYPRESTE et al, 2005). Novas pesquisas devem ser realizadas em cada região brasileira para se obter dados mais apurados sobre a prevalência da doença, assim como a padronização de métodos para se ter dados reais do status da doença no país.

Em pequenos ruminantes a doença foi reproduzida experimentalmente por Silva (1968) em ovinos e caprinos por Poester e Ramos (1994) utilizando isolamentos de micobactérias de origem bovina.

Recentemente Oliveira, et al (2010), relatou casos de paratuberculose clínica em animais providos de dois rebanhos de criação conjunta de caprinos e ovinos no nordeste, sertão paraibano, que diagnosticou a doença em um cabra de três anos de idade, que apresentava emagrecimento há aproximadamente um ano, dispnéia, tosse seca, arritmia cardíaca, edema submandibular, apetite caprichoso, pêlo sem brilho, áspero e quebradiço e apresentava áreas de alopecia bilateral, com formação de crostas na região e uma ovelha com três anos que se apresentou caquética, com fezes pastosas e áreas bilaterais de alopecia na região dorsal, cujos os sinais tinham se agravado 20 dias após o parto. O diagnóstico foi realizado pela presença de enterite e linfadenite granulomatosa, que são lesões características da doença, e pela presença de bacilos álcool-ácido resistente na coloração de Ziel-Nielsen e com marcação positiva para *Mycobacterium* spp. na imuno-histoquímica.

Ainda na Paraíba, Medeiros et al (2012), verificou a presença da doença subclínica em caprinos e ovinos de 14 municípios do semiárido Paraibano, através da determinação de anticorpos pelo ELISA para o Map, encontrando uma frequência média de caprinos $44,86 \pm 22,91\%$ e em ovinos de $52,96 \pm 31,49$.

As micobactérias pertencem à ordem Actinomycetales, e a Família Mycobacteriaceae. O gênero *Mycobacterium* inclui o complexo *M. tuberculosis* e o complexo *M. avium* complex, outras micobactérias e numerosas espécies saprófitas presentes no solo e na água (GOMES MJP, 2011).

O complexo *M. avium* inclui *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. intracellulare*. (GOMES MJP, 2011)

Mycobacterium avium (subsp.) *paratuberculosis* (Map), são bastonetes finos, gram-positivos; aeróbios; crescimento lento, patógeno obrigatório, Álcool-

Ácido-Resistentes (AAR.). A propriedade de BAAR está relacionada à grande quantidade de material gorduroso (Lipídio) da parede celular, sendo importante na identificação das micobactérias. O componente lipídico da parede celular representa mais de 60% do peso seco. Esta elevada percentagem de lipídios desempenha um papel crucial na adaptação da micobactéria ao crescimento em macrófagos, bem como na resistência a drogas, aos desinfetantes e resistência aos anticorpos (RASTOGI et al., 2001), além de possuir outras propriedades como a hidrofobicidade, a alta resistência a processos químicos como a cloração da água e a processos físicos como a pasteurização (GRANT et al, 1999; WHAN et al, 2001)

As bactérias contêm receptores de membrana específicos para o transporte do ferro e excretam complexos solúveis de ferro (sideróforos), que são captados por receptores de membrana e posteriormente são liberados na célula por hidrólise. (BARCLAY, 1985). A maioria das espécies do gênero *Mycobacterium* spp produz dois sideróforos: micobactina e exoquelina (GOMES, 2002), porém, o Map não produz micobactina incapacitando-o de sequestrar o ferro fora do hospedeiro; tornando-o dependente. A dependência à micobactina não é exclusiva do Map, outras espécies tais como *M. avium* subsp. *silvaticum* e outras cepas de *M. avium* também apresentam esta característica. Este vínculo com a micobactina pode ser substituída pela ação de altas concentrações de ferro no meio artificial de cultivo (COCITO et al., 1994).

Esses micro-organismos são encontrados em grumos no interior de macrófagos na lâmina própria intestinal, principalmente na válvula-ileocecal e nas fezes de animais infectados. Fatores como exposição à luz solar, calor, urina, desinfetantes e o processo de ensilagem inibe seu crescimento (STEHMAN S.M., 1993). É destruído pelo formol a 5%, sulfato de cobre a 5 % e o cresol a 10%

(BANNANTINE et al., 2002). Contudo, podem sobreviver em solo úmido ou alagado por até um ano (SCHELCHER: ESPINASSE, 1990) e em fezes, sobrevivem durante 8 meses mantendo a sua viabilidade e capacidade reprodutiva. Fatores como pH intestinal de animais lactantes e o pH alcalino do solo, favorecem a latência do micro-organismo (RICHARDS, 1981; JOHNSON-IFEARULUNDU; KANEENE, 1997).

A doença é transmitida através da eliminação do organismo nas fezes de animais infectados; o risco aumenta quando o animal está na fase clínica terminal o qual excreta entre $1,3 \times 10^5$ e $5,9 \times 10^9$ organismos por grama de fezes (MANNING; COLLINS, 2001).

O contágio entre animais faz-se principalmente pela contaminação oro-fecal em 80% dos casos. Na maioria das situações a infecção ocorre em animais jovens, através da amamentação, onde as tetas podem estar contaminadas com as fezes, ou diretamente pela ingestão de colostro ou leite de vacas infectadas. Por serem filhotes o sistema imunitário é mais susceptível, estando sujeito a um maior risco de infecção (MOMOTANI et al., 1988). Existem outros tipos de transmissão os quais ainda estão sendo estudados; o contágio inter-espécies o qual afirma a possibilidade de infecção de ovinos com bovinos, caprinos, cervídeos vice-versa; a transmissão intra-uterina ou por sêmen de machos infectados também foi relatada (SWEENEY, 1996; BUERGELT; GINH, 2002; BIELANSKI et al., 2006). A transmissão ocorre com mais frequência em animais que permanecem em confinamento e esta pode ser uma das razões para a maior prevalência da doença ser em rebanhos leiteiros se comparar com os de corte (MERKAL et al, 1998).

Especula-se que podem existir diferentes estirpes do Map, que infectam determinadas espécies. Há estirpes distintas em bovinos e ovinos, que são

classificados como tipo C e tipo S, respectivamente. A infecção cruzada entre as espécies pode ocorrer, porém, são necessárias mais pesquisas para determinar o grau em que estes 2 tipos de Map podem realmente atravessar a barreira inter-espécies. Há também evidência de que as espécies selvagens, particularmente coelhos podem desempenhar um papel na dispersão da bactéria no ambiente, provocando a contaminação na pastagem (DANIELS et al., 2003).

Após a ingestão de alimentos ou água contaminada, os bacilos irão se localizar inicialmente ao nível das tonsilas e das placas de Peyer do íleo (SWEENEY, 1996). As tonsilas têm sido relatadas como uma porta de entrada alternativa para Map quando a dose de infecção é alta, e acredita-se também que esse meio de infecção, possa ser o caminho mais curto para a corrente sanguínea (MOSS et al , 1991).

Ao invadirem a mucosa do íleo, os bacilos são captados pelas células M que revestem as placas de Peyer na lâmina própria (STEHMAN S.M., 1993). Dentro da célula, ocorre a multiplicação da micobactéria provocando o aumento de volume celular e o deslocamento do núcleo para os pólos; como consequência da multiplicação, as células morrem, as bactérias são liberadas e novamente fagocitadas, provocando acúmulos de macrófagos nas camadas profundas da lâmina própria, tomando caráter de célula epitelióide (SWEENEY R. W. 1996; CARTER, 1988).

Devido à excessiva reação imunitária provocada pela infiltração de milhões de células epitelióides, um aspecto de “pregas” na mucosa irá se formar no intestino, que se assemelham a circunvoluções cerebelares. Essa modificação na mucosa altera as trocas sanguíneas promovendo uma má absorção intestinal e o animal pode demonstrar sinais de fraqueza muscular, hipoproteinemia, edema e

como consequência final a diarreia. Raras vezes surge um caso de septicemia com localizações secundárias (DARCOSO FILHO et al, 1960, SCHELCHER;ESPINASSE, 1990,).

A sintomatologia em caprinos e ovinos é retratada de maneira geral por sinais típicos como: emaciação progressiva, desidratação, casos esporádicos de diarreia profusa, redução na produção de leite, onde o quadro clínico evolui a morte por inanição. (CHIODINI; ROSSITER 1996; COLLINS, 1997). Em ambas as espécies, a diarreia não é grave ou está ausente, um aspecto diferente dos bovinos nos quais a diarreia é um sinal clínico característico (RADOSTITS et al. 2007). Especula-se que as fezes de caprinos e ovinos por serem naturalmente mais secas do que as dos bovinos, seria necessário que se desenvolvesse uma lesão intestinal muito maior para produzir diarreia (SMITH;SHERMAN, 1994).

Os ovinos no início da infecção podem perder peso por até quatro meses, serem parcialmente anoréxicos e suas fezes apresentarem com aspecto normal, tornando moles a pastosas nos estágios finais da doença. Nos caprinos a depressão e a dispnéia também podem acompanhar a infecção (RADOSTITS et al., 2007).

Na forma subclínica da doença não se percebem os sinais, mas o animal elimina e dissemina o agente no ambiente, através das fezes (RIET-CORREA;DRIEMEIER, 2007; RADOSTITS et al. 2007). A doença clínica se manifesta apenas na vida adulta, geralmente após dois anos de infecção subclínica. Fatores estressantes tais como parto, transporte, parasitismo, aleitamento e má nutrição, podem estimular o desencadeamento dos sinais clínicos (GOMES MJP, 2002; RADOSTITS et al. 2007, MOTA et al, 2007). Os pequenos ruminantes podem ser assintomáticos na idade de 2 até 7 anos (PUGH, 2004).

Na patologia observa-se durante a necropsia que as lesões macroscópicas se concentram na parte terminal do íleo (intestino delgado) e nos linfonodos associados (DRIEMEIER et al., 1999). Pode ser visualizados inflamação e aumento do tamanho de 15 a 20 vezes o normal da válvula íleocecal (SILVA, 1968; NAKAJIMA et al, 1991); linfonodos mesentéricos e íleocecais hipertrofiados, edematosos e pálidos, com fraca distinção cortico-medula (STEHMAN S.M., 1993, CATTON, 2002). Engrossamento da mucosa e formação de pregas transversais que, não desaparecem após realizar a manipulação do tecido; são lesões importantes nessa doença, porém, nos caprinos é pouco frequente a visualização deste achado (CORPA et al. 2000, BARKER I.K. 2007, OLIVEIRA et al. 2010) e nos ovinos observa-se espessamento da mucosa com uma coloração amarelo-alaranjado (MATHIAS D., 1988; CLARKE;LITTLE, 1996). A observação macroscópica destas lesões são características de animais com sintomatologia, contudo, a ausência das mesmas não excluirá esta doença (GARRIDO et al., 2000).

Em animais clinicamente infectados observa-se na histopatologia, duas formas de lesões: multibacilar e paucibacilar. A multibacilar (lepromatosa) é caracterizada por um elevado número de macrófagos na lâmina própria preenchido por abundantes BAAR e; a paucibacilar (tuberculóide) caracteriza-se por infiltrado linfocítico difuso na lâmina própria, com poucas micobactérias visível (HARRIS; BARLETTA, 2001; KRUIZE et al, 2006). As duas formas associadas, chamadas de formas limítrofes (*borderline forms*), apresentam-se quando há sinais clínicos mais graves (CLARKE; LITTLE, 1996; PÉREZ et al. 1996). Em caprinos clinicamente infectados classificam-se as lesões em focais ou difusas do tipo multibacilar, linfocítica ou mista (CORPA et al. 2000), porém observa-se com maior frequência o acometimento da lesão paucibacilar (COTTON, 2002). A forma lepromatosa

difusa é visto com mais frequência em ovinos (COELHO et al. 2007, OLIVEIRA et al. 2010, HAILAT et al. 2010).

Nos preparados corados pela técnica de Ziehl-Neelsen vêem-se numerosos agrupamentos de BAAR, intracitoplasmáticos nos macrófagos em animais clinicamente infectados (CORPA et al, 2000). Entretanto, ovinos e caprinos podem estar infectados com o Map, apresentar lesões intestinais e não demonstrar a micobactéria nos macrófagos; isso indica que a bactéria não é onipresente dificultando o diagnóstico nos pequenos ruminantes (CLARKE;LITTLE, 1996; CATTON, 2002).

Inserir um programa adequado de controle da paratuberculose é um trabalho árduo, pois, deve-se primeiramente identificar os animais com doença subclínica, por que nesta fase já possuem a capacidade de excretar grandes quantidades de bacilos no ambiente (COCITO et al, 1994), porém métodos de diagnóstico disponíveis atualmente são insatisfatórios para a detecção rápida e confirmatória do agente (STABEL et al, 1998, OIE, 2009).

O diagnóstico da paratuberculose baseia-se na identificação do agente etiológico ou na detecção da resposta imune frente ao agente (COCITO et al., 1994; MANNING;COLLINS, 2001). Nos pequenos ruminantes, como a diarreia não é uma característica patognomônica desta doença, o diagnóstico clínico-epidemiológico se torna complexo, pois pode ser confundido com outras doenças. A principal ferramenta para elucidar os casos suspeitos é realizada através do diagnóstico laboratorial.

Há vários testes que podem confirmar a presença do Map. no animal infectado; dentre eles a mais utilizada por oferecer uma resposta rápida e precisa é a baciloscopia que, consiste na visualização microscópica de bacilos AAR

provenientes de preparações de fezes ou fragmentos da mucosa retal ou intestinal, corada pela técnica de Ziehl-Neelsen (NAVARRO et al, 1998).

O teste de diagnóstico considerado padrão de referência é o isolamento do Map em meio de cultivo com a adição de antimicrobianos e fatores de crescimento bacteriano específicos. Os meios utilizados para o isolamento de micobactérias, são aqueles à base de gema de ovo com micobactina J; como o de Herrold (HEYM, *Herrold egg yolk medium*), ou o de Löwenstein-Jensen (ADURIZ et al., 1995; GARRIDO et al, 2002; OIE, 2009). O processo é laborioso e demorado, devido ao longo período de incubação que exige grande capacidade de armazenamento levando cerca de 8 a 16 semanas a 37° C além disso, há desvantagens com as contaminações secundárias (WHIPPLE et al., 1991; STEWART et al., 2004). As melhores amostras utilizadas no isolamento do Map em ovinos e caprinos, é a válvula íleo-cecal e os linfonodos mesentéricos (STEHMAN S.M., 1993; EUROPEAN COMMISSION, 2000).

Além das técnicas citadas, outros métodos que possam diagnosticar a infecção pelo Map abrangem: o ELISA; a PCR, a fixação do complemento; imunodifusão em gel de ágar; ensaio imunoenzimático e o teste do interferon gama (COLLINS, 1997).

Não há resultados satisfatórios no tratamento de animais acometidos pela paratuberculose. O uso de antibióticos ameniza os sinais clínicos e reduz a excreção do microrganismo nas fezes, porém não é capaz de eliminar completamente a infecção. Os animais doentes são descartados e o controle é realizado a partir do manejo, eliminando o risco da transmissão da doença entre os animais (JOHNSON-IFEARULUNDU et al, 1997; NRCNA, 2003).

As vacinas atuais existentes não protegem completamente os animais e ainda há risco de reações cruzadas. Elas foram desenvolvidas para reduzir o número de animais com sinais clínicos e assim diminuir a excreção do micro-organismo pelas fezes, diminuindo a prevalência da enfermidade no rebanho. Entretanto animais vacinados podem apresentar resultados positivos no teste de tuberculina interferindo no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT); por esse motivo ela não é recomendada (COCITO, et al, 1994)

No Brasil não há programas sanitários para o controle desta doença, entretanto, para evitar a propagação da infecção, medidas simples e preventivas podem ser realizadas: a higiene das instalações; separação dos animais jovens dos adultos; evitar contaminação de fezes de animais infectados com alimentos e água, com limpeza dos bebedouros e comedouros; separação do recém-nascido da mãe infectada, evitando a ingestão de colostro e leite utilizando substituto de leite para os filhotes (CHIODINI et al., 1984; GOMES MJP, 2002; PUGH, 2004; RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007).

Fatores indicativos de risco tais como a susceptibilidade do hospedeiro e os fatores ambientais também devem ser estudados e avaliados para a promoção de um programa de controle necessário e eficaz (OTT et al. 1999; SHAWN et al, 2006).

A faixa etária no momento da exposição pela bactéria é um fator importante para determinar se um animal eventualmente torna-se-á infectado. Animais jovens por terem seu sistema imune ainda incompleto, requerem uma dose mais baixa do que os animais mais velhos (HAGAN W.A., 1938;CHIODINE, 1996). O leite ou colostro de fêmeas infectadas podem servir como fonte do Map para recém-nascidos (SWEENEY R.W., 1996; SHAWN et al, 2006).

Outros fatores como: má nutrição, estresse relacionado ao transporte, parto, imunossupressão ou doenças virais têm sido propostos como fatores biologicamente plausíveis que podem acelerar ou precipitar o início da infecção (KENNEDY;BENEDICTUS 2001).

Em relação aos fatores ambientais, é conhecido que a infecção pode ocorrer por via orol-fecal direta, onde a exposição às fezes contaminadas pode potencialmente levar a novas infecções. No entanto, ainda há a possibilidade de transmissão indireta, através da contaminação das fezes em bebedouros, máquinas usadas no fornecimento de alimentos, ou pelo tratador. Portanto, quaisquer atividades de manejo que direta ou indiretamente leva a exposição de animais suscetíveis à fezes de animais infectados, podem ser consideradas como fatores de risco (JORGENSEN J.B., 1977), então a melhor forma de aplicar práticas de gestão, a fim de diminuir a ocorrência de novas infecções é reduzir o número de animais infectados que podem expelir o agente nas fezes (SHAWN et al, 2006).

Devido à essas inúmeras combinações entre o agente, hospedeiro e ambiente é necessário a realização e implementação de estratégias relacionadas ao manejo dos animais, de acordo com cada região, que possam reduzir a propagação do Map. e assim promover maior impacto no bem estar animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACYPRESTE, C. S. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação. *Ciência Animal Brasileira*. V.6, p.41-45, 2005.
2. ADÚRIZ J.J., JUSTE R.A., CORTABARRIA N. Lack of mycobactin dependence of mycobactéria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Veterinary Microbioly*, vol. 45, p. 211-217, 1995.
3. ALONSO-HEARN M., GEIJO M., VAZQUEZ P., SEVILLA I., GARRIDO J.M., JUSTE R.A., Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Muscle Tissue of Naturally Infected Cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*. May 2009, Vol. 6, No. 4: 513-518

4. BANNANTINE, J.P., BAECHLER, E. ZHANG Q., Li. L.L., KAPUR, V., Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *Journal Clinic Microbiol*, vol. 40, p.1303-1310, 2002.
5. BARKER I.K. *The alimentary system*., In: Maxie M.G., Jubb Kennedy & Palmer (Eds), *Pathology of Domestic Animals*. Vol.2. 5th ed. Elsevier, Oxford, p.291-296., 2007.
6. BIELANSKI, A., ALGIRE, J., RANDALL, G., AND SURUJBALLI, O. "Risk of transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by embryo transfer of in vivo and in vitro fertilized bovine embryos". *Theriogenology*, vol. 66, p.260-266, 2006.
7. BARCLAY, R. The role of iron in infection. *Medical Laboratory Science*, v. 42, p. 166-177, 1985.
8. BUERGELT, C. D.; GINN, P. E. The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American Bison (*Bison bison*). *Veterinary Microbiology*. vol 77, p.325-331, 2000.
9. CATTON B.M., *Paucibacillary paratuberculosis in a goat*. *Can Vet Jor*. Vol. 43, p. 787-788, 2002.
10. CHIODINI R.J. & ROSSITER C.A. Paratuberculosis a Potencial Zoonosis, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. vol 12, n.2, p.457-467, 1996.
11. CHIODINI, R. J.; VAN KRUIINGEN, H. J.; MERKAL, R. S. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Veterinary*, v. 74, p. 218-22, 1984
12. CLARKE C. J.. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other Species: A review, *Journal of Comparative Pathology*. vol. 116, n.3, p. 217-261, 1997
13. CLARKE CJ, LITTLE D. The pathology of ovine paratuberculosis: Gross and histologic changes in the intestines and other tissues. *Journal of Comparative Pathology*. vol.114, p.419-437, 1996.
14. COCITO P., GILOTO P., et al, Paratuberculosis, *Clinical Microbiology Reviews*, vol 7, p. 328-345, 1994
15. COELHO A.C.; et al. 2007. Pathology of ovine paratuberculosis in the North East of Portugal. A comparison of histopathology, faeces and tissue culture, polymerase chain reaction in blood, faeces and tissues, and serology. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*. 9:155-156
16. COLLINS, M.T. *Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen? *Journal of Dairy Science*, vol 80, n. 12, p.3445-3448, 1997.
17. CORPA J.M., GARRIDO J., GARCÍA MARÍN J.F., PÉREZ V. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *Journal of Comparative Pathology*. vol 1229, n.4, p.255-265, 2000.
18. DACORSO FILHO, P.; CAMPOS, I.O.N.; FARIA, J.F.; LANGENEGGER, J. Doença de Johne (paratuberculose) em bovinos nacionais. *Arquivos do Instituto de Biologia Animal*, v.3, p.129-139, 1960.
19. DANIELS MJ, HUTCHINGS MR, GREIG A. The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiology Infection*; vol.130, p.561-568, 2003.
20. DRIEMEIER, D. et al. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 19, n. 3-4, p. 109-115, 1999.
21. DUPONT, O. *Jornal do Comércio do Rio de Janeiro* de 05/11/1915, 1915.
22. EUROPEAN COMMISSION SANCO/B3/R16. Possible links between Crohn's disease and paratuberculosis. *Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare*, 76 p. , 2000
23. GARRIDO, URKULLU JOSEBA MIRENA. *Puesta a punto de técnicas PCR en heces y de ELISA para el diagnóstico de la paratuberculosis. Estudio de prevalencia*

- en ganado bovino*. Tese para a obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária. Zaragoza: Universidade de Zaragoza, 2002, 256 p. Disponível em: <<http://www.mastesis.com>>
24. GOMES M. J. P., 2011, Gênero *Mycobacterium* spp., LABCVET, Microbiologia Clínica Veterinária VET- 3225- Área de Bacteriologia - UFRGS., Disponível em: <<http://www.foxitsoftware.com>>. Acesso em 05 de Fevereiro de 2012
 25. GOMES, M.J.P. 2002. Aspectos Epidemiológicos da paratuberculose bovina no Rio Grande do Sul. 139p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
 26. GRANT I. R. et al. Effect of higher pasteurization temperatures and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Micobacterium paratuberculosis* in milk. *Letters in Applid Microbiology*. v.28, n.6, p.461-465. Jun.1999
 27. HAGAN WA. Age as a factor in susceptibility to Johne's disease. *Cornell Veterinary*, vol 28, p.34, 1938.
 28. HAILATI N.Q. HANANEH W., METEKIA A.S., STABEL J.R., AL-MAJALI A., LAFI S. 2010. Pathology of subclinical paratuberculosis (Johne's Disease) in Awassi sheep with reference to its occurrence in Jordan. *Veterinary Medicina*, 12 (55): 590-602.
 29. HARRIS N.B. & BARLETTA R.G., *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in veterinary medicine. *Clinic Microbiology*. Vol 14, n.3, p. 489-512, 2001.
 30. JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. J. & KANEENE, J. B. Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 210, n. 12, p 735-740, 1997.
 31. JORGENSEN JB. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nordisk Veterinaer Medicin*, vol 29, p.267-270, 1977.
 32. KENNEDY DJ, BENEDICTUS G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in agricultural species. *Review Scientihific Technology* ;vol 20, p.151-179, 2001.
 33. KRUZE J.; SALGUADO M.; PEREDES E.; MELLA A. COLLINS T. M., Goat paratuberculosis in Chile: first isolation and confirmation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in a dairy goat. *Journal Veterinary Diagnostic*. V.18, p.476-479, 2006.
 34. LARANJA DA FONSCUCA L. P. et al. Identificação da presença de anticorpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos leiteiros do estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*. v.66, p.122-126, 1999
 35. MANNING, EJ.B. & COLLINS, M.T. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*; Vol. 20, n. 1, p.133-143, 2001.
 36. MATHIAS D., *Infecções por micobactérias*. In: BEER J., *Doenças Infeciosas em animais domésticos*, São Paulo, Vol. 2, p. 286-289, 1988.
 37. MEDEIROS J.M.A.; GARINO F.J.; ALMEIDA P.A.; LUCENA E. A.; RIET-CORREA F., Paratuberculose em caprinos e ovinos no Estado da Paraíba, *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol 32, n. 2, p.111-115, 2012.
 38. MENZIES P., 2010. *Johne's disease in sheep*. Department of Population Medicine, Ontario Veterinary College. In: www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/sheep/facts/johnsdis
 39. MERKAL, R.S.; WHIPPLE, D.L.; S ACKS, J.M.; S NYDER, G. R. Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol.190, n.6, p.676-680, Mar. 15, 1998.
 40. MILLAR D, FORD J, SANDARSON J, WITHEY S, TIZARD M, DORAN T, HERMON-TAYLOR J., IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized milk in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p.3446-3452. 1996.
-

41. MOMOTANI, E.; WHIPLE, D.I.; THIERMANN, A.B.; CHEVILLE, N.F. Role of M-cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches of calves. *Veterinary Pathology*, v. 25, p. 131-137, 1988.
 42. MOSS MT, GREEN EP, TIZARD ML, MALIK ZP, HERMON-TAYLOR J: Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA hybridisation with a fragment of the insertion element IS900. *Gut*, vol 32, p. 395-398, 1991.
 43. MOTA . R. A., JUNIOR P. W. J., GOMES M.J.P. , PEIXOTO R.M., MAIA F.C.L., BRITO M.F., CHIES J.A.B., SNEL G.G.M., BERCHT B.S., JUFFO G.D., Paratuberculose em um rebanho bovino leiteiro no Estado de Pernambuco, PE, *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo, vol. 74, n.2. p.73-79, 2007.
 44. NAKAJIMA, M.; MAIA, F.C.L.; MOTA, P.M.P.C. 1991. Diagnóstico da Paratuberculose em Minas Gerais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO EM MICOBACTÉRIAS, 4., 1991, Bauru, SP. Anais. Bauru, 1991. (Resumo 67)
 45. NAVARRO, J.A., RAMIS, G., SEVA, J., PALLARES, F.J., SANCHEY, J., Changes in lymphocyte subsets in the intestine and mesenteric lymph nodes in caprine paratuberculosis. *Journal of Comparative Pathology*. Vol 118, p.109–121, 1998.
 46. NRCNA. NACIONAL RESEARCH COUNCAL OF THE NACIONAL ACADEMIES. Diagnosis and controlo f johne's disease. Washington, 2003
 47. OIE. OIE Listed Diseases. 2009. Disponível em <http://www.oie.int/eng/maladies/en_classification2009b.htm>.. Acessado em 15 out. 2010
 48. OKURA H., TOLF N., POZZATO N., TONDO A. NIELSEM S.S.. Apparent Prevalence of Beef Carcasses Contaminated with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Sampled from Danish Slaughter Cattle. *Veterinary Medicine International*, Jan. 2011, Vol 1-7.
 49. OLIVEIRA D.M., RIET-CORREA F., GALIZA G.J.N., ASSIS A.C.O., DANTAS A.F.M., BANDARRA P.M. & GARINO JR. F. 2010. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol 30, n.1, p.67-72, 2010.
 50. OTT SL, WELLS SJ, WAGNER BA. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive Veteterinary Medicine*; vol 40, p.179–192, 1999.
 51. PEREZ, V., GARCIA MARIN, J.F., BADIOLA, J.J., *Description and classification of different types of lesions associated with natural paratuberculosis infection in sheep*. J. Comp. Pathol. Vol. 114, p. 107–122, 1996
 52. POESTER F.P. & RAMOS E.T. Infecção experimental em caprinos com *Mycobaterium paratuberculosis* de origem bovina. *Ciência Rural*, vol 24, n.2, p.333-337, 1994.
 53. PUGH D. G. *Enfermidades do sistema gastrointestinal: Doença de Johne*. In: *Clínica de Ovinos e Caprinos*, São Paulo: Roca, 2004, p.103-104.
 54. RADOSTITS O.M., GAY C.C., HINCHCLIFF K.W. & CONSTABLE P.T. *Veterinary Medicine*. 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh, p.1017-1044, 2007.
 55. RASTOGI N, LEGRAND E, SOLA C: The mycobactéria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Review Scienci Techinology*, vol 20, p.21-54, 2001.
 56. RICHARDS, W.D. Effects of physical and chemical factors on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 14, p. 587-588, 1981.
 57. RIET-CORREA F. & DRIEMEIER D. *Paratuberculose*. In : *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (eds). 3 ed. Pallotti, Santa Maria, 2007, p.407-412.
 58. RISTOW, P., Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. *The Veterinary Journal*. v.174, n. 2, p.432-434, 2007.
 59. SCHELCHER, F., ESPINASSE, J., Pathogénie de la paratuberculose bovine dans Actualités 90 en buiatrie. *Société française de buiatrie Editeur*, p.74-82, 1990.
-

60. SILVA, N. M. Estudos sobre a paratuberculose. IV. Infecção experimental de ovino com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 3, p. 285-289, 1968.
-
61. SMITH M.C. & SHERMAN D.M., *Goat Medicine*. Baltimore City, USA: Williams and Wilkins, p.307, 1994.
62. STABEL J.R. Johne's disease: a hidden threat. *Journal of Dairy Scienc.* Jan.v. 81, n.1, p.283-288, 1998
63. STEHMAN, S.M. Moléstia de Johne (paratuberculose). In: SMITH, B.P.(Ed). *Tratado de Medicina Veterinária Interna de Grandes Animais: moléstias de equinos, ovinos e caprinos*. São Paulo: Manole, p.823-830, 1993.
64. STEWART DJ, VAUGHAN JA, STILES PL, NOSKE PJ, TIZARD ML, PROWSE SJ, MICHALSKI WP, BUTLER KL, JONES SL; A Long-term study in Merino sheep experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Veterinary Microbiology*, vol 104, p. 165-178, 2004.
65. SHAWN L.B. MCKENNA, GREG P. KEEFE, ASHWANI TIWARI, JOHN VANLEEUEWEN, HERMAN W. BARKEMA. Johne's disease in Canada Part II: Disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Canada Veterinary Journal*; vol. 47, p.:1089-1099, 2006
66. SWEENEY R.W., Transmission of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*; vol 12, p.305-312, 1996.
67. TEIXEIRA, P. E SIMÕES, J. A paratuberculose bovina em explorações leiteiras de pequena e média dimensão: que opções para o veterinário assistente? *PUBVET*, Londrina, v.2, n.43, Art 412, Out5, 2008.
68. WADDELL, L.A.; RAJIĆ, A.; SARGEANT, J. et al. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis: a systematic review. *Canadian Journal Of Public Health-Revue Canadienne De Sante Publique*, v.99, p.145-155, 2008.
69. WHAN L. B. et al. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Letters in Applied Microbiology*. V.33, n.3, p.227-231, sep. 2001
70. WHIPPLE, D.L.; CALLIHAN, D.R.; JARNAGIN, J.L. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from specimens and a suggested standardized procedures. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*; vol 3, p. 368-373, 1991.

CAPITULO II

Ocorrência de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em caprinos e ovinos abatidos em matadouros na Paraíba

Manuscrito submetido a Revista Pesquisa Veterinária Brasileira de acordo com que estabelece a norma nº 01/2008 de 2011 do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural- Campus de Patos-PB

Ocorrência de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em caprinos e ovinos abatidos em matadouros na Paraíba

Soraia V. Justiniano²; Felício Garino Jr ²; Diego M. Oliveira²;
Mateus Matiuzzi³; Gisele Veneroni Gouveia³; Aticcus Tanikawa²

ABSTRACT.- Justiniano S. V., Garino Jr F., Oliveira D. M., Matiuzzi M., Gouveia G. V., Tanikawa A. [Survey of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in goats and sheep slaughterhouse provided in Paraíba] Pesquisa de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis em caprinos e ovinos providos de matadouros na Paraíba. Pesquisa Veterinária Brasileira 33(0):00-00. Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB 58700-000, Brazil.

This study aimed to investigate the occurrence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (Map) in goats and sheep sent to slaughter in the State of Paraíba. The slaughterhouses were selected by the possibility of access. Samples of mesenteric lymph nodes and ileocecal valves were collected from 151 animals (77 sheep and 74 goats) to diagnosis paratuberculosis by the histopathological examination using Hematoxylin and Eosin staining and Ziehl-Neelsen, the Polymerase Chain Reaction (PCR). In histopathology by H & E staining, there were no nonspecific inflammatory lesions consistent with paratuberculosis. There were not visualized acid-fast bacillus at he resistant samples, however, by the PCR technique, 15.6% studied in sheep and goats 12.16% were positive for Map. Regarding PCR, no significant difference in frequencies between goats and sheep of different ages, gender and origin, however, the higher occurrence of infected animals was found in the town of Esperança with 24% of positivity. This fact proves that goats and sheep for slaughter may be carried by the Map and can be considered as a source of food contamination. Research about epidemiology, prevalence and control form of the disease tailored to each region should be developed to avoid the possibility of transmission to humans.

INDEXING TERMS: small ruminants, paratuberculosis, PCR, Ziehl-Neelsen

¹ Recebido em

² Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Campus de Patos, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB 58700-000, Brasil. *Autor para correspondência: garinofjr@hotmail.com

³ Universidade Federal do Vale de São Francisco, Campus Petrolina, Rodovia BR 407, 12 Lote 543 - Projeto de Irrigação, Nilo Coelho - S/N C1, CEP: 56300-990 - Petrolina/PE.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência do Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (Map.) em caprinos e ovinos enviados para o abate, no

estado da Paraíba. Os matadouros foram selecionados de acordo com a possibilidade de acesso. Amostras de linfonodos mesentéricos e válvulas ileocecal foram coletadas de 151 animais (77 ovinos e 74 caprinos) para a realização do diagnóstico de paratuberculose mediante o exame histopatológico utilizando as colorações de Hematoxilina e Eosina e Ziehl-Neelsen, a Reação em Cadeia Polimerase (PCR). Na histopatologia pela coloração de H&E, observaram-se inflamações inespecíficas não condizentes com lesões de paratuberculose. Não foram visualizados bacilos álcool-ácido-resistentes nas amostras, entretanto, pela a técnica da PCR, 15,6% dos ovinos estudados e 12,16% dos caprinos foram positivos para o Map. Em relação ao PCR, não houve diferença significativa nas frequências entre caprinos e ovinos de diferentes idades, sexo e procedência, porém, a maior ocorrência encontrada de animais infectados foi no município de Esperança com 24% de positividade. Este fato comprova que caprinos e ovinos de abate podem ser portadores do Map podendo ser considerado como uma fonte de contaminação alimentar. O presente estudo produziu a primeira detecção do Map em amostras de tecidos no Brasil. Pesquisas sobre a epidemiologia, prevalência e forma de controle da doença adaptadas a cada região, devem ser desenvolvidas para que não ocorra a possibilidade de transmissão para humanos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: pequenos ruminantes, paratuberculose, PCR, Ziehl-Neelsen.

INTRODUÇÃO

Com o aumento da exploração de caprinos e ovinos de corte no nordeste brasileiro surgiu, a preocupação com as doenças infectocontagiosas inter-espécies e as zoonoses. Dentre essas, destaca-se a paratuberculose ou doença de Johne a qual é considerada atualmente como uma doença emergente; é uma enfermidade infectocontagiosa crônica, incurável de distribuição mundial, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). Atinge mamíferos, com particular relevância, pequenos e grandes ruminantes, equinos, suínos, lhama, búfalo, camelo e animais silvestres. Causando enterite e linfadenite granulomatosa crônica (Clarke 1997, Harris & Barletta 2001, Barker 2007, Riet-Correa & Driemeier 2007, Teixeira & Simões, 2008), sendo caracterizada por síndrome de má absorção, perda de peso e diarreia (Driemeier 2007, Carvalho et al 2008); mas esporadicamente pode ocorrer casos de abortos, mastite e diminuição da fertilidade (Garrido et al. 2000).

A doença possui elevada importância econômica porque provoca altos prejuízos, relacionados principalmente a rebanhos leiteiros (Ott et al. 1999; Driemeier *et al.*, 1999) onde o custo da doença nos EUA, por caso clínico em bovinos foi de US\$ 250 milhões por ano e em ovinos o custo é de US\$ 90 (Menzies, 2010). Além de gerar impactos na produtividade dos rebanhos como: redução da produção de leite, redução no teor de proteína do leite, número de bezerros nascidos vivos, valor dos bezerros, taxa de descarte, condição corporal do animal descartado, redução na qualidade da carne, taxa de mortalidade, valor dos animais mortos e a redução na fertilidade (Stabel, 1998). E também com os custos relativos à mão-de-obra, dieta, despesas com veterinários, exames e drogas (Dias 2000; Radostits et al. 2007; Menzies 2010, Okura et al 2011). No Brasil não há estudos publicados sobre o impacto econômico desta doença (Gomes et al 2002).

O longo período de incubação influencia no impacto da economia, pois, os animais infectados assintomáticos são responsáveis pela propagação do agente no ambiente e assim são fontes de contaminação para o rebanho (Jonhson et al 2001)

Além das perdas econômicas ligadas ao setor produtivo, acredita-se que a micobactéria causadora da paratuberculose, possua potencial zoonótico o qual está relacionada com a Doença de Crohn (CD) em humanos, que pode causar diarreia crônica e progredir à morte (Kennedy e Allworth 2000; Chiodini & Rossiter 1996). Pesquisas realizadas por Alonso-Hearn et al, (2009) e Okura et al, (2011), diagnosticaram o Map no músculo masseter e no músculo do diafragma de carcaças bovinas. Este fato sugere que os seres humanos podem ser potencialmente expostos a este agente pelo consumo de produtos lácteos e cárneos.

A paratuberculose pode acometer os animais sob duas formas: a doença clínica com, sinais típicos de emagrecimento rápido e progressivo, diarreia crônica, falha ao tratamento com antimicrobianos, apetite caprichoso e redução na produção de leite; e a subclínica onde os sinais clínicos não são perceptíveis, porém o animal pode disseminar o agente microbiano no ambiente (Collins 1997; Chiodini et al., 1984). Em pequenos ruminantes a diarreia não é grave ou está ausente. Os ovinos podem perder peso por até quatro meses, serem parcialmente anoréxicos e suas fezes encontrarem-se normais, tornando moles a pastosas nos estágios finais da doença. Nos caprinos, a depressão e a dispnéia são sinais clínicos que podem acompanhar a infecção (Radostits et al. 2007).

Dupont (1915) diagnosticou o primeiro caso de paratuberculose em bovinos no estado do Rio de Janeiro (Brasil). Desde então a doença vem sendo pesquisada. No nordeste foi diagnosticado casos em bovinos leiteiros por (Mota et al, 2007) no estado de Pernambuco. Em pequenos ruminantes a doença foi reproduzida experimentalmente por Silva (1968) em ovinos e por Poester e Ramos (1994) em caprinos, utilizando isolamentos de micobactérias de origem bovina. No Brasil os primeiros relatos da doença clínica foi diagnosticada por Oliveira et al (2010), em rebanhos de caprinos e ovinos na Paraíba e a doença subclínica por Medeiros et al (2012), que avaliou a frequência de anticorpos para o Map, através do ELISA, em fazendas de caprinovonicultura no semiárido paraibano.

Existem diversas técnicas de diagnóstico que confirmam a paratuberculose em animais clinicamente infectados, porém em animais assintomáticos é difícil identificar um teste em que se obtenha um resultado satisfatório. A baixa sensibilidade e especificidade dos atuais testes tem sido um dos principais obstáculos para o diagnóstico.

Por ser uma doença zoonótica que provoca perdas econômicas impactantes no setor produtivo e por ser uma enfermidade difícil de ser diagnosticada, principalmente relacionado a animais infectados subclínicamente, este estudo surge para pesquisar a ocorrência desta enfermidade em pequenos ruminantes enviados para o abate.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no período de maio de 2010 a novembro de 2011. Foram coletadas aleatoriamente válvulas íleocecais e linfonodos adjacentes, de 77 ovinos e 74 caprinos oriundos de matadouros da cidade de Esperança-PB (microrregião paraibana que faz parte do agreste da Borborema) e Patos-PB (sertão da Paraíba) que recebiam animais de várias cidades: Areia, Remígio, Barra de Santa Rosa, Tabira/PE, Chorrochó/BA, Sumé, Olho d'água, São José de Espinharas, São

José do Bonfim. Esses abatedouros foram selecionados de acordo com a possibilidade de acesso.

As coletas foram realizadas semanalmente, em aproximadamente 10% dos animais do lote dos matadouros.

Dados como sexo e idade dos animais foram coletados. A idade cronológica foi avaliada por meio da dentição, conforme Albuquerque (2006), em que pôde ser dividida em: dente de leite para os animais que apresentavam todos os dentes incisivos caducos, 1ª muda: para os animais que apresentavam 2 dentes incisivos definitivos (pinças) = 1 ano de idade; 2ª Muda: para os animais que apresentavam 4 dentes incisivos definitivos (pinças e primeiro médio) = 2 anos de idade; 3ª Muda: para os animais que apresentavam 6 dentes incisivos definitivos (pinças, primeiro e segundo médios) = 3 anos de idade; 8 dentes incisivos definitivos (pinças, os médios e cantos) = 4 anos de idade (“Boca Cheia”).

Investigou-se também a procedência dos animais através do Guia de Transporte Animal (GTA) ou pelo proprietário.

Uma parte das amostras foram armazenadas e fixadas em formol 10% para a confecção da lâmina corada pelo método de Hematoxilina & Eosina e Ziehl-Neelsen, outra parte acondicionadas em microtubos de polipropileno e congeladas a -20°C para a realização da Reação em Cadeia Polimerase (PCR).

As lesões observadas pela coloração de H&E foram descritas como lesões inflamatórias específicas para a paratuberculose, com a presença de macrófagos espumosos, linfócitos e células epitelióides na lâmina própria da mucosa e/ou submucosa, ou como lesões inespecíficas.

Para a extração do DNA, os tecidos inicialmente foram macerados em nitrogênio líquido. Em seguida 200mg do tecido macerado foi armazenado em microtubos de 1,5 ml. Oitocentos microlitros de uma solução de extração contendo 50mM Tris-HCL pH 8, 25mM EDTA e 400mM NaCl foram colocados no microtubo junto com o material macerado. Cem microlitros de SDS (Dodecil sulfato de sódio) 10% e 0,2 mg de proteinase K também foram adicionados ao microtubo. O material foi vortexado e incubado a 65°C por 5 horas. Após a incubação 450 μ l foram transferidos para um novo microtubo e 442 μ l de NaCl 2M foram adicionados em cada tubo, os quais foram incubados a 4°C por 15 minutos. Em seguida 450 μ l de cada tubo foi transferido para outro microtubo, onde foram adicionados 50 μ l de acetato de sódio 3M. O material foi centrifugado a 14000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e colocado em outro microtubo, onde foi acrescentado 1 ml de etanol gelado para precipitação do ácido nucléico. Os microtubos foram levemente agitados e centrifugados a 14000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuscitado em 500 μ l de TE+RNase (100 μ g/ml). As amostras foram colocadas em banho seco a 40°C por 30 minutos. Em seguida, 500 μ l de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foram adicionados ao material e os microtubos foram agitados por inversão. Depois centrifugados a 14000rpm por 10 minutos, a primeira fase do material foi coletada e colocada em outro tubo. Novamente o DNA foi precipitado com a utilização de etanol 100% e ao final foi ressuscitado em 50 μ l de Tris- EDTA (TE).

Na PCR foram utilizados os primers DF (5'-GACGACTCGACCGCTAATTG-3') e DR1 (5'-CCGTAACCGTCATTGTCCAG-3'), descritos por Taddei et al. (2007), que amplificaram uma região de 99 pb do elemento de inserção IS900, específica para detecção molecular de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. As reações de amplificação constaram de tampão de reação 1X, 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,2 mM de cada dNTP, 0,8 μ M

de cada primer, 2.5 U da enzima Taq DNA polimerase e 5 µl de DNA em uma reação com volume final de 25 µL. A reação foi constituída das seguintes etapas: 5 minutos a 96°C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C e 3 minutos a 72°C. Cada amostra foi processada com um controle negativo e um controle positivo, o qual foi cedido pelo LANAGRO – MG. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, as barras resultantes foram fotografadas e registrados através do sistema de captura de imagem Kodak Digitalscience 1D.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de Qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates e o nível de significância adotado foi de 5%. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa GRAPHPAD INSTAT versão 3.0 para Windows 95, GraphPad Software.

RESULTADOS

No exame histopatológico com H&E, foi verificado que nenhuma amostra apresentou lesões condizentes com a doença; observou-se que 62,1% (46/74) amostras de caprinos e 86% (66/76) de ovinos apresentaram lesões inflamatórias inespecíficas.

Com a coloração de Ziehl-Neelsen, não foram observadas bactérias álcool-ácido-resistente na válvula ileocecal e linfonodo dos caprinos e ovinos.

Dentre os 151 animais (caprinos e ovinos) estudados, 21 (14%) amostras submetidas à PCR apresentaram amplificação do elemento de inserção IS900, sendo 12 (15,58%) dos 77 ovinos estudados e 9 (12,16%) dos 74 caprinos (FIG.12). Desses animais positivos foi verificado que não houve diferenças significativas relacionadas ao sexo (Quadros 1-2) e a faixa etária entre caprinos e ovinos (Quadro 3). Entretanto notou-se uma ocorrência maior em ovinos com até 1 ano de idade.

Comparando os municípios de origem dos animais, verificou-se que houve maior ocorrência em Esperança onde, dos 47 animais selecionados, 8 foram positivos na PCR e desses 24% (6/25) são ovinos e 9% (2/22) são caprinos (Quadro 4).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No exame histopatológico observou-se que os achados inflamatórios inespecíficos se caracterizavam por infiltrados moderados linfoplasmocíticos, contudo não foram observadas lesões sugestivas de paratuberculose. Esses achados foram considerados acidentais, pois, podem ser decorrentes de uma leve enterite, parasitismo, doença bacteriana recorrente.

Woodbury et al (2008) em sua pesquisa com 16 cervídeos sadios no Canadá, utilizando amostras de tecidos, verificaram, através da PCR que 4 amostras de válvula ileocecal e 3 de linfonodos foram positivas para o Map e apenas em uma amostra a histopatologia detectou lesões características da paratuberculose com a presença de bactérias álcool-ácido resistentes, células gigantes multinucleadas e macrófagos epitelioides, em ambos tecidos. A ocorrência deste achado sugere que lesões do Map podem não ser encontradas em tecidos de animais subclínicos, contudo o DNA do Map pode ser detectado pela técnica da PCR, semelhante ao encontrado neste estudo.

A baciloscopia tem sido utilizada como referência para determinar a infecção pela micobactéria em pequenos ruminantes (Clarke e Little, 1996; Perez et al, 1997). Segundo Coelho et al.(2008) a visualização de bacilos álcool-ácido

resistentes em fragmentos de tecidos, é uma prova rápida e sensível que oferece bons resultados em ovinos e caprinos, porém, nos casos em que a carga bacteriana é baixa (casos subclínicos), é possível a não visualização dos bacilos ao exame microscópico, que pode explicar os resultados negativos à coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) neste estudo; e positivos em outras técnicas. O mesmo foi afirmado por Hailat et al (2010) e Buergelt & Ginn (2000). Além disso, Michael e Bastianello (2002), relataram que na doença subclínica é muito difícil a detecção de bactérias por microscopia de luz, devido à possíveis mudanças na parede celular durante a preparação de tecidos e pelo processamento. Devido a este fato muitos organismos não consegue corar com a fuscina dificultando a visualização da bactéria (Condron et al, 1995; Clarke e Little, 1996).

Uma pesquisa realizada no Canadá por Martinson et al (2008), utilizando 204 vacas leiteiras de descarte, concluiu que dentre os testes de diagnóstico realizados (cultura, baciloscopia ZN e imunohistoquímica) para a determinação do Map, a sensibilidade do ZN em relação a cultura é bastante baixa pois, neste estudo foi isolado o Map da cultura positiva de 78 amostras de fígado e das 107 amostras de linfonodo e os BAARs só foram identificados em 7 de 78 (8,97%) e 6 de 107 (5,61%). Percebe-se então que o diagnóstico pelo uso da baciloscopia não é um teste satisfatório, apresentando dificuldades para um diagnóstico eficaz, em se tratando de animais sem evidência clínica.

No Brasil, até o presente estudo, não foram relatados casos de paratuberculose em animais de abate, principalmente em caprinos e ovinos. Este é o primeiro estudo realizado na Paraíba, utilizando amostras de tecido para determinar a ocorrência do Map. em caprinos e ovinos enviados para abate.

Em Portugal, um trabalho realizado por Coelho et al. (2007), com ovinos, utilizando diferentes técnicas de diagnóstico para o Map., verificaram que 5 (16,66%) de 30 amostras avaliadas, não apresentaram evidência histológica e a cultura bacteriológica foi negativa, porém na PCR utilizando amostras de tecidos foram detectados como positivos, semelhante ao encontrado neste estudo, onde pela PCR foram identificadas em 21/151 (14%) amostras de tecido positivas, a micobactéria, todavia nestas amostras não foram visualizadas pela coloração de ZN. Os mesmos autores ainda afirmam em sua pesquisa que a positividade na PCR em amostras de tecidos tem um valor de confiança elevado se comparado com sangue e fezes, concluindo que a PCR em tecidos, é um meio mais sensível de diagnóstico em relação a outras técnicas. Resultados semelhantes foram encontrados por Tripathi et al. (2006) que, realizaram uma pesquisa com 43 cabras adultas na Índia, sem sinais clínicos aparentes, utilizando amostras de tecidos (jejuno, íleo, válvula ileocecal, linfonodos), onde a micobactéria foi diagnosticada em 88,4% dos animais estudados pela técnica da PCR.

Confrontando os resultados deste estudo com dados dos autores acima, é visto que, a detecção do Map em animais com doença subclínica é um trabalho laborioso, entretanto, todas essas pesquisas utilizaram a PCR como principal meio de diagnóstico pois, detecta o DNA residual, mesmo que em pequenas quantidades; além disso o uso de amostras de tecidos nos trabalhos, foi um material de boa acurácia para o diagnóstico, sendo considerado uma ótima matriz para a real detecção de patógenos em animais infectados subclínicamente.

Trabalhos publicados que envolvam caprinos e ovinos de abate relacionados com a paratuberculose são escassos, contudo, há estudos que abrangem bovinos de corte; como a pesquisa desenvolvida por Etinkaya et al. (1996) que investigou a ocorrência do Map em bovinos de corte no sudoeste da Inglaterra, usando a PCR em

amostras de linfonodos e porções do intestino, que de 1.553 animais 51 (3,3%) foram positivos. Outro estudo realizado por Munster et al. (2011) avaliando 99 amostras de linfonodos e válvulas ileoceais de vacas, no matadouro da Baixa Saxônica/Alémanha, identificou por meio da PCR 17,17% animais positivos. Como a patogenia da micobactéria é igual nos ruminantes, pode-se determinar com esses resultados que os animais enviados para o abate podem ser portadores de paratuberculose e como meio de avaliar a presença dessa doença, devem-se coletar preferencialmente os ganglios linfáticos mesentéricos e válvulas ileoceais, objetivando um diagnóstico preciso.

Observou-se com os resultados desta pesquisa que não houve diferença significativa entre os grupos etários e o sexo dos animais diagnosticados positivos.

Alguns autores [Chiodini & Rossiter (1996), Corpa et al. (2000); Driemeier et al. (1999)] afirmam que as fêmeas de bovinos são mais susceptíveis a infecção e a transmissão do Map principalmente por via oro-fecal, devido, a disseminação do agente, nos últimos estágios da doença, pelo útero, fetos, colostro e leite. Todavia, apesar da baixa ocorrência do Map. neste estudo verificou-se que machos caprinos apresentavam uma frequência maior de infecção, se comparados com as fêmeas.

Em relação a faixa etária, foi observado que os ovinos e caprinos infectados apresentavam idade variando de 8 meses a 4 anos, e que a maior frequência encontrada foi em ovinos com até 1 ano. Segundo Momotani et al (1988) e Chiodini & Rossiter (1996) os animais jovens estão mais sujeitos a infecção devido a maior sensibilidade do seu sistema imune, se comparado com a dos adultos. Discordando com Medeiros et al (2012), que em seu estudo detectou a maior frequência de anticorpos contra o Map. em ovinos acima de 2 anos de idade; e com Singh et al. (2007) na Índia que, diagnosticou por meio da PCR do sangue, a presença da micobactéria em 23/40 (57,8%) caprinos de até 1 ano e 34/36 (94,4%) cabras adultas. Contudo neste último estudo os autores afirmam que a alta prevalência em adultos pode ser atribuída as raças pesquisadas (Jamunapri e Barbari) que são consideradas como susceptíveis a infecção pelo Map. naquela região.

Avaliando os resultados deste estudo, denota-se a importância dos matadouros avaliados receberem animais de diferentes regiões do nordeste. Este fato alerta para o possível risco de transmissão via alimentos e a disseminação do micro-organismo entre diferentes rebanhos e regiões.

Estudos relativos ao diagnóstico de uma infecção subclínica nessas espécies é um grande desafio a ser realizado, principalmente no Brasil. Em virtude dos resultados obtidos neste estudo, pesquisas devem ser realizadas em ovinos e caprinos e em animais de abate, principalmente na região do nordeste, onde a caprinovinocultura representa grande importância econômica, para em fim conhecer o real status da doença.

Como os resultados obtidos no presente estudo, demonstraram amostras positivas na PCR e negativos no ZN e H&E, isso indica que outros tipos de testes com maior sensibilidade e especificidade devem ser realizados.

Agradecimentos: A Capes pela concessão da bolsa do Mestrado e ao Departamento de Patologia Animal da UFCG/ Patos/PB.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, F.H.M.A.R. **Efeito do flushing e de cruzamentos sobre a produção de cordeiros e desempenho de ovelhas Santa Inês**. 2006. 55f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Alonso-Hearn M., Geijo M., Vazquez P., Sevilla I., Garrido J.M., Juste R.A., 2009, Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Muscle Tissue of Naturally Infected Cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*. May, 6(4): 513-518
- Barker I.K. 2007. **The alimentary system**, p.1-296. In: Maxie M.G., Jubb Kennedy & Palmer (Eds), *Pathology of Domestic Animals*. Vol.2. 5th ed. Elsevier, Oxford.
- Buergelt, C. D.; Ginn, P. E. 2000. **The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American Bison (*Bison bison*)**. *Veterinary Microbiology*. 77:325-331.
- Carvalho I. A., **Isolamento e Detecção molecular de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* em rebanhos bovinos leiteiros na região de Viçosa (MG)** 2008. 55f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa- Minas Gerais
- Chiodini R. J. & Rossiter C. A. 1996. **Paratuberculosis: A potential zoonosis?**, *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 12(2):457-467.
- Chiodini R.J.; Kruiningen H.J.; Merkal R.S. 1984. **Ruminant paratuberculosis (Johne's Disease): The Current Status and Future Prospects**. *Cornell Vet.*, 74:218-262.
- Clarke C. J. 1997. **The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other Species: A review**, *J. Comp. Pathol.* 116 (3): 217-261.
- Clarke C.J.& Little D. 1996. **The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* the intestine and other organs**. *J. Comp Pathol.* 114:419-437.
- Coelho A.C.; Coelho A. M.; Pinto M.L.; Rodrigues J. 2008. **Coloração de Ziehl-Neelsen como método rápido de diagnóstico de paratuberculose ovina**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e zootecnia*, 60(5):1097-1102.
- Coelho A.C.; et al. 2007. **Pathology of ovine paratuberculosis in the North East of Portugal. A comparison of histopathology, faeces and tissue culture, polymerase chain reaction in blood, faeces and tissues, and serology**. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*. 9:155-156
- Collins, M.T. 1997. ***Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen?** *Journal of Dairy Science*, 80(12):3445-3448.
- Condrón RJ, Schroen CJ, Black CA, Ridge SE, Hope AF. 1995 **Histological confirmation of subclinical infection with *M. paratuberculosis* in cattle**. *Proc 4th Int Colloq Paratuberculosis*. 1995;4:37-40.
- Corpa J.M., Garrido J., García Marín J.F. & Pérez V. 2000. **Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats**. *J. Comp. Pathol.* 1229(4):255-265.
- Dias, Renata de Oliveira Souza. 2000 . Custos e Incidência da Paratuberculose. Radar Técnico. Disponível em < Http://: <http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/sanidade/custos-e-incidencia-da-paratuberculose-16653n.aspx>>. Acesso em: 07 de Julho de 2012
- Dupont, O. **Jornal do Comércio do Rio de Janeiro** de 05/11/1915, 1915.
- Driemeier, D. ; Cruz, C. E. F.; Gomes, M. J. P.; Corbellini, L. G.; Loretti, A.P.; Colodel, E. M. 1999. **Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul**. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 1(1):109-115, jul./dez.
- Etinkaya B., Egan k., Harbour D. A.; Morgan K. L. 1996. **An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johne's disease in adult cattle in south west England**. *Epidemiol. Infect.*, 116:373-379.
- Gomes, M.J.P. 2002. **Aspectos Epidemiológicos da paratuberculose bovina no Rio Grande do Sul**. 139p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

- Hailati N.Q., Hananeh W., Metekia A.S., Stabel J.R., Al-Majali A., Lafi S. 2010. **Pathology of subclinical paratuberculosis (Johne's Disease) in Awassi sheep with reference to its occurrence in Jordan.** *Veterinary Medicina*, 12 (55): 590-602.
- Harris N.B. & Barletta R.G.. 2001. **Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in veterinary medicine.** *Clin. Microbiol.* 14(3):489-512.
- Johnson, Y., Kaneene, J.B., Gardinner, J.C., Lloyd, J.W., Sprecher, D.J., Coe, P.H., 2001. **The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on milk production in Michigan dairy cows.** *J. Dairy Sci.* 84, 2188-2194.
- Kennedy D.J., Allworth M.B., 2000. **Progress control and assurance programs of bovine Johne's disease in Australia.** *Veterinary Microbiology*, 77:443-451.
- Martinson SA, Hanna PE, Ikede BO, Lewis JP, Miller LM, Keefe GP, McKenna SL. 2008 **Comparison of bacterial culture, histopathology, and immunohistochemistry for the diagnosis of Johne's disease in culled dairy cows.** *Vet Diagn Invest.* Jan;20(1):51-7.
-
- Medeiros J.M.A.; Junior F. G.; Almeida P.A.; Lucena E. A.; Riet-Correa F., 2012. **Paratuberculose em caprinos e ovinos no Estado da Paraíba,** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(2):111-115.
- Menzies P., 2010. **Johne's disease in sheep.** Department of Population Medicine, Ontario Veterinary College. In: www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/sheep/facts/johnsdis
- Micheal A. L.; Bastianello S. S., 2002. **Paratuberculosis in sheep an emerging disease in South Africa.** *Veterinary Microbiology.* 77:299-307.
- Mota . R. A., Junior P. W. J., Gomes M.J.P. , Peixoto R.M., Maia F.C.L., Brito M.F., Chies J.A.B., Snel G.G.M., Bercht B.S., Juffo G.D., 2007. **Paratuberculose em um rebanho bovino leiteiro no Estado de Pernambuco, PE,** *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, 74(2):73-79.
- Momotani, E.; Whiple, D.I.; Thiermann, A.B.; Cheville, N.F. 1988. Role of M-cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches of calves. *Veterinary Pathology*, 25:131-137.
- Munster P., Volkel I., Wemheuer W., Petschenk J., Wemheuer W., Steinbrunn C., Campe A., Schulz-Schaeffer W. J., Kreienbrock L., Czerny C., 2011. **Detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in ileocaecal lymph nodes collected from elderly slaughter cows using a semi-nested IS900 polymerase chain reaction.** *Veterinary Microbiology*, 154:197-201.
- Oliveira D.M., Riet-Correa F., Galiza G.J.N., Assis A.C.O., Dantas A.F.M., Bandarra P.M. & Garino Jr. F. 2010. **Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(1):67-72.
- Okura H., Tolf N., Pozzato N., Tondo A., Nielsem S.S., 2011. **Apparent Prevalence of Beef Carcasses Contaminated with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis** Sampled from Danish Slaughter Cattle. *Veterinary Medicine International*, Jan. 2: 1-7.
- Ott S.L., Wells S.J. & Wagner B.A. 1999. **Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations.** *Prev. Vet. Med.* 40(3-4):179-192.
- Perez, V., Garcia Marin, J.F., Badiola, J.J., 1996. **Description and classification of different types of lesions associated with natural paratuberculosis infection in sheep.** *J. Comp. Pathol.* 114:107-122.
- Poester F.P. & Ramos E.T. 1994. **Infecção experimental em caprinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina.** *Ciência Rural*, 24(2):333-337.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.T. 2007. **Veterinary Medicine.** 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh, p.1017-1044.
- Riet-Correa F. & Driemeier D. 2007. **Paratuberculose. In : Doenças de Ruminantes e Equídeos.** Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (eds). 3 ed. Pallotti, Santa Maria, p.407-412.

- Silva, N. M. 1968. Estudos sobre a paratuberculose. IV. **Infecção experimental de ovino com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, 3: 285-289.
- Singh S.V., Singh A.V., Singh P.K., Gupta V.K., Kumar S. & Vohra J. 2007. **Sero-prevalence of paratuberculosis in young kids using 'Bison type', *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen in plate ELISA.** Small Rum. Res. 70(2-3): 89-92.
- Stabel J.R. 1998. **Johne's disease: a hidden threat.** Journal of Dairy Scienci. Jan.81(1):283-288
- Stehman, S.M. Moléstia de Johne (paratuberculose). 1993. In: SMITH, B.P.(Ed). **Tratado de Medicina Veterinária Interna de Grandes Animais: moléstias de eqüinos, ovinos e caprinos.** São Paulo: Manole, p.823-830.
- Taddei, R.; Barbieri, I.; Pacciarini, M.L.; Fallacara, F.; Belletti, G.L. Arrigoni, N. 2008 ***Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: Implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture.** Veterinary Microbiology, 130:338-47.
- Teixeira, P. e Simões, J. 2008. **A paratuberculose bovina em explorações leiteiras de pequena e média dimensão: que opções para o veterinário assistente?** PUBVET, Londrina, 2(43), Art 412, Out5.
- Tripathi B.N., Periasamy S., Paliwal O.P., Singh N., 2006. **Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, johnin and serological tests for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats.** Veterinary Microbiology, 116:129-137.
- Whipple, D.L.; Callihan, D.R.; Jarnagin, J.L. 1991. **Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from specimens and a suggested standardized procedures.** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 3:368-373.
- Woodbury M. R., Chirino-Trejo M., Mihajlovic B. 2008 **Diagnostic detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in white-tailed deer.** Canadian Veterinary Journal,49: 683-688.

FIGURA

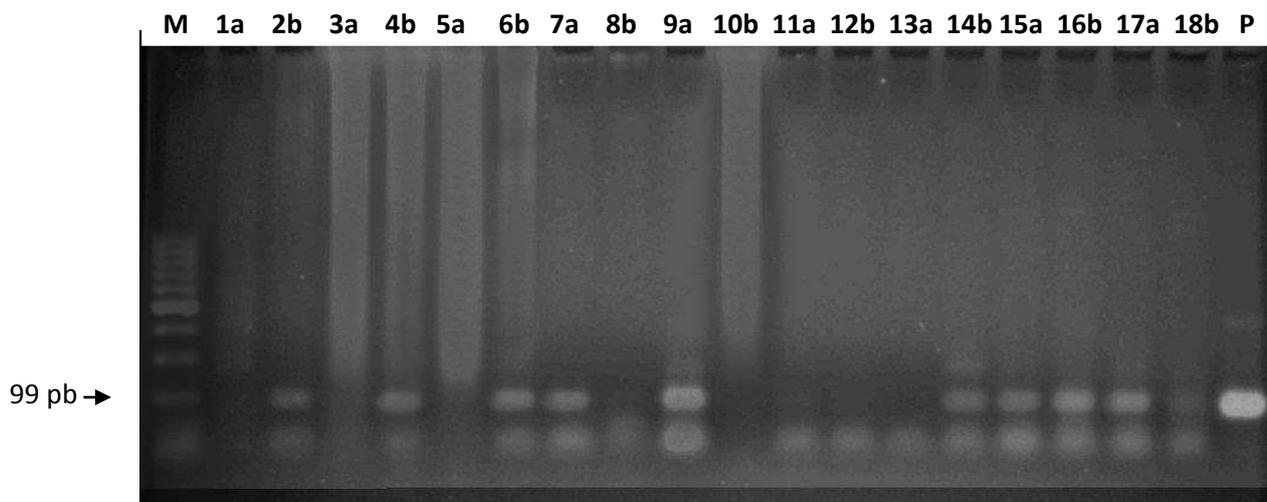


FIG. 1 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da válvula ileocecal e linfonodo de caprinos e ovinos, para a verificação do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Coluna 1: Padrão de peso molecular de 99 pb. Colunas 3, 5, 7, 8, 10, 15, 16, 17, 18 apresentam amostras positivas e as colunas 2, 4, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 19 amostras negativas. P: Controle positivo; M: Marcação do peso molecular. * a= válvula ileocecal/ b=linfonodo

QUADROS

Quadro 1. Resultado da Reação em Cadeia Polimerase (PCR) de tecidos (válvula ileocecal e linfonodo adjacente) de 33 ovinos machos e 44 fêmeas, providos de matadouro na Paraíba, para a verificação do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. 2012

RESULTADO	VALVULA ILEOCECAL		LINFONODO		TOTAL
	MACHOS	FEMEAS	MACHOS	FEMEAS	
POSITIVO	5 (15,15%)	2 (4,54%)	4 (12,12%)	6 (13,63%)	12 (31,8%)
NEGATIVO	28 (84,84%)	42 (95,45%)	29 (87,87%)	38 (86,36%)	65 (84,4%)

Quadro 2. Resultado da Reação em Cadeia Polimerase (PCR) de tecido (válvula ileocecal e linfonodo adjacente) de 45 caprinos machos e 29 fêmeas, providos de matadouro na Paraíba, para a verificação do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. 2012

RESULTADO	VALVULA ILEOCECAL		LINFONODO		TOTAL
	MACHOS	FEMEAS	MACHOS	FEMEAS	
POSITIVO	4 (5,4%)	2 (6,89%)	3 (4,05%)	2 (6,89%)	9 (23,67%)
NEGATIVO	41 (55,4%)	27 (89,65%)	42 (56,75%)	26 (89,65%)	65 (87,8%)

Quadro 3. Resultado positivo da PCR para a verificação do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em 76 amostras de ovinos e 74 de caprinos a partir da válvula ileocecal e linfonodo em animais de 1 à 4 anos. Paraíba. 2012

	OVINOS	CAPRINOS
Ate 1 ano de idade	4/17 (23,53%)	2/21 (9,52%)
Ate 2 anos de idade	4/22 (18,18%)	2/21 (9,52%)
Ate 4 anos de idade	4/38 (10,53%)	5/32 (15,63%)

Quadro 4. Explicação dos resultados positivos na PCR para a verificação do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. de ovinos e caprinos providos de diferentes municípios na Paraíba e demais estados. 2012

MUNICIPIOS	OVINOS		CAPRINOS	
	POSITIVO	TOTAL*	POSITIVO	TOTAL*
AREIA/PB	1 (10%)	10	1 (33,3%)	3
SUME/PB	1 (20%)	5	2 (20%)	10
OLHO D'AGUA/PB	0	0	1 (9%)	11

SÃO JOSÉ DO BONFIM/PB	0	0	2 (16,6%)	12
TABIRA/PE	0	0	1 (7,69%)	13
ESPERANÇA/PB	6 (24%)	25	2 (9,09%)	22
BARRA DE SANTA ROSA/PB	1 (20%)	5	0	0
PATOS / PB	1 (6,67%)	15	0	0
CHORROCHO/BA	2 (25%)	8	0	0

*- Total de Amotras Coletadas

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que este é o primeiro estudo realizado na Paraíba, para determinar a ocorrência do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em caprinos e ovinos enviados para abate. Como houve resultados positivos; também há o possível risco de transmissão via alimentos e a disseminação do micro-organismo entre diferentes rebanhos e regiões.

A realização dos dois trabalhos permitiu conhecer mais sobre a doença e o quanto as pesquisas nesse assunto estão evoluindo principalmente por se tratar de uma zoonose e por causas grandes e importantes prejuízos econômicos.

Sabe-se que a paratuberculose não tem tratamento e o único meio é através prevenção, a partir do manejo dos animais associado ao conhecimento dos fatores de risco, para assim evitar a infecção e propagação do agente.

É fato que diversos estudos devem ser realizados explorando com maior frequência as espécies caprina e ovina, pois a nossa região é bastante rica com a criação pecuária desses animais.

ANEXOS

Informações básicas

Os trabalhos enviados para publicação deverão ser inéditos e destinados exclusivamente a esta Revista. A matéria publicada será de inteira responsabilidade do(s) autor(es). Os trabalhos não aceitos para publicação serão comunicados aos autores pelo Comitê Editorial.

O Comitê Editorial fará análise dos trabalhos antes de submetê-los aos Consultores Científicos.

A publicação dos trabalhos dependerá da análise efetuada pelo Corpo de Consultores Científicos e da aprovação do Comitê Editorial.

Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

Serão considerados para publicação Artigos Científicos e Comunicações Científicas.

Artigos de Revisão poderão ser aceitos a critério do Comitê Editorial. Eventuais dúvidas podem ser encaminhadas ao editor da Revista "Arquivos do Instituto Biológico", Dra. Silvia Regina Galletti, Instituto Biológico - Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP - Fone: (11) 5087-1749 - E-mail: arquivos@biologico.sp.gov.br.

Direitos autorais

A transcrição parcial ou total de trabalhos dos "Arquivos do Instituto Biológico" para outras revistas é permitida desde que citada a origem. O uso comercial das informações é proibido.

Taxa para publicação: a taxa para publicação na revista "Arquivos do Instituto Biológico" é de R\$ 25,00 (vinte e cinco reais) por página diagramada. Após o aceite do trabalho, comunicado pelo editor responsável, os autores deverão efetuar o depósito do valor correspondente à publicação em nome do Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio - FUNDEPAG (CNPJ 50.276.237/0001-78) (Banco do Brasil (001), Agência 1199-1, Conta Corrente 30.200-7 ou Banco Banespa (033), Agência 0637, Conta Corrente 13-001316-9). Enviar comprovante de depósito via fax ou e-mail, mencionando o número do trabalho, para: (11) 5087-1790 ou E-mail: arquivos@biologico.sp.gov.br

Preparação dos originais

O original deve ser submetido apenas na forma eletrônica através do e-mail arquivos@biologico.sp.gov.br.

O arquivo não deverá exceder 2 Mb.

No e-mail de encaminhamento deverá constar nome por extenso, endereço completo (Instituição/Universidade, Centro/Faculdade, Laboratório/Departamento, endereço postal), endereço eletrônico e CPF de todos os autores.

Apresentação: os trabalhos deverão ser digitados em Word 97 ou versão superior, página A4, com margens de 2,5 cm, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço duplo e páginas numeradas em seqüência.

As linhas deverão ser numeradas de forma contínua, utilizando a ferramenta Layout em Configurar Página.

O máximo de páginas será 25 para artigos de revisão, 20 para artigos científicos e 10 para comunicação científica, incluindo tabelas e figuras.

Artigo científico: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referências.

Comunicação científica: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, texto sem subdivisões e referências.

Artigo de revisão: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, texto sem subdivisões e referências.

Aprovação do trabalho pela Comissão de Ética e Biossegurança: quando o trabalho envolver estudos em animais de experimentação e/ou organismos geneticamente modificados, incluir o número do processo no trabalho e encaminhar uma cópia da aprovação fornecida pelo respectivo Comitê responsável da Instituição de origem do primeiro autor.

Idioma: o trabalho poderá ser redigido em português, inglês ou espanhol. Quando escrito em português, o resumo deverá ter uma versão em inglês. No caso de artigo escrito em inglês ou espanhol deverá ter um resumo em inglês ou espanhol e outro em português.

Título: embora breve, deverá indicar com precisão o assunto tratado no artigo, focalizando bem a sua finalidade principal.

Endereço(s) do(s) autor(es): abaixo do(s) nome(s) do(s) autor(es), com chamada numérica. Descrever endereço postal (Instituição/Universidade, Centro/Faculdade, Laboratório/Departamento, estado, país) e eletrônico do autor principal. No rodapé da primeira lauda descrever somente a Instituição e Departamento dos demais autores.

Resumo: deverá apresentar concisamente o objetivo do trabalho, material e métodos e conclusões, em um único parágrafo. Não ultrapassar 250 palavras.

Palavras-chave: abaixo do resumo e separado por um espaço, citar no máximo cinco palavras-chave, separadas por vírgula. Evitar termos que apareçam no título.

Abstract: apresentar uma tradução para o inglês, do título do trabalho e do resumo. A seguir, relacionar também em inglês (ou espanhol) as mesmas palavras-chave (key words, palabras-clave) já citadas. Não ultrapassar 250 palavras.

Introdução: descrever a natureza e o objetivo do trabalho, sua relação com outras pesquisas no contexto do conhecimento existente e a justificativa da pesquisa feita.

Material e Métodos: apresentar descrição breve, porém suficiente para permitir uma repetição do trabalho. Técnicas e processos já publicados, exceto quando modificados, deverão ser apenas citados. Nomes científicos de espécies, bem como drogas, deverão ser citados de acordo com regras e padrões internacionais.

Resultados: apresentá-los acompanhado de tabelas e/ou figuras, quando necessário. As tabelas e figuras devem ser inseridas após as referências.

Discussão: discutir os resultados obtidos comparando-os com os de outros trabalhos publicados (resultados e discussão poderão fazer parte de um único item).

Tabelas e Figuras: incluir título claro e conciso que possibilite o seu entendimento sem consultas ao texto. As tabelas não deverão conter linhas verticais. No texto, use a palavra abreviada (ex.: Fig. 3). As figuras devem estar no formato jpg (fotos) ou gif (gráficos e esquemas) e com tamanho inferior a 500 Kb. As figuras originais ou com maior resolução poderão ser solicitadas após o aceite. Devem ser enviadas em arquivos individuais e nomeadas de acordo com o número da figura. Exemplos: Fig1.gif, Fig2.jpg.

Conclusões: serão citadas em ordem de importância. Poderão constituir um item à parte ou serem incluídas na discussão.

Agradecimentos: poderão ser incluídos a pessoas ou instituições. Referências e citações no texto: citações no texto e referências estão diretamente vinculadas. Todos os autores citados devem figurar nas referências, exceção para informações obtidas por canais informais que deverão ser citadas apenas no texto: (JUNQUEIRA, comunicação pessoal), (JUNQUEIRA, informação verbal). A referência no texto deve seguir o sistema sobrenome do autor e ano de publicação e deverá estar em caixa alta reduzida ou versaleta, tal como: 1 autor - ALLAN (1979) ou (ALLAN, 1979); 2 autores – LOPES; MACEDO (1982) ou (LOPES; MACEDO, 1982); mais de 2 autores - BESSE et al. (1990) ou (BESSE et al., 1990); coincidências de autoria e ano de publicação - (CURI, 1998a), (CURI, 1998b) ou (CURI, 1998a, 1998b). As referências deverão ser baseadas na Norma NBR 6023/2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e estar em ordem alfabética de primeiro autor. A exatidão dos dados nas referências é da responsabilidade dos autores.

Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de

apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos

devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Helvética, corpo 11, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails de outros autores;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano,

colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão "jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível,

com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.