



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**PEDRO PAULO FEITOSA DE ALBUQUERQUE**

**Epidemiologia molecular de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*  
em amostras biológicas de bovinos, bubalinos e queijo tipo coalho**

**Recife  
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**PEDRO PAULO FEITOSA DE ALBUQUERQUE**

**Epidemiologia molecular de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*  
em amostras biológicas de bovinos, bubalinos e queijo tipo coalho**

Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor/Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

**Recife  
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A345e Albuquerque, Pedro Paulo Feitosa de  
Epidemiologia molecular de *Mycobacterium avium* subsp.  
*paratuberculosis* em amostras biológicas de bovinos, bubalinos e  
queijo tipo coalho / Pedro Paulo Feitosa de Albuquerque. – 2018.  
88 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal,  
Recife, BR-PE, 2018.  
Inclui referências e anexo (s).

1. Paratuberculose 2. IS900 3. IS1311 4. Análise de restrição  
enzimática 5. Reação em cadeia da polimerase I. Mota, Rinaldo  
Aparecido.

CDD 636.089

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

Tese elaborada por

**PEDRO PAULO FEITOSA DE ALBUQUERQUE**

**Epidemiologia molecular de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*  
em amostras biológicas de bovinos, bubalinos e queijo tipo coalho**

Aprovada em     /     /

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota  
Presidente/Orientador  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior  
Membro Titular  
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior  
Membro Titular  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Profa. Dra. Érika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti  
Membro Titular  
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Profa. Dra. Karla Patrícia Chaves da Silva  
Membro Titular  
Departamento de Medicina Veterinária – UFAL

## **Reflexões**

*“Saber como pensar torna a pessoa muito mais capaz do que aquele que apenas sabe o que deve pensar”.*

**Neil deGrasse Tyson**

## Agradecimentos

Desde o início do curso em Medicina Veterinária despertei a vontade de realizar uma pesquisa de doutorado; queria muito conseguir essa conquista e de alguma forma tentar contribuir cientificamente para a sociedade e os animais. Sabia que o caminho não seria fácil, mas, fui agraciado por Deus que sempre me vigiou e abençoou colocando pessoas maravilhosas e situações em minha vida que tornaram essa caminhada mais prazerosa.

Agradeço então, a Ti Senhor por isso.

Agradeço à minha família, aos meus avós Arcanjo (*in memoriam*), Mãezinha (*in memoriam*), Edson e Eucésia que com muito amor se sacrificaram para formar todos os filhos, e, que esses também se sacrificaram para formar os seus. Em especial agradeço aos meus pais, Arcanjo Filho e Lúcia de Fátima por todo amor oferecido e por nunca terem negado um livro quando solicitado pelos filhos, amo vocês. Agradeço a minha querida esposa Luciana por todo estímulo, amor, carinho e compreensão ofertados durante a realização deste sonho de vida, principalmente nos momentos de maior estresse, pois era você quem estava lá sempre me apoiando, te amo muito. Obrigado aos meus queridos irmãos (Chico e Camila) e respectivos cunhados (Luanna e Marco) por todo apoio fornecido e aos meus queridos sobrinhos, cujos sorrisos me fazem ganhar o dia. Obrigado aos meus sogros Adailton e Socorro e também a minha cunhada Tatiana, aos meus queridos tios e tias, primos e primas! Amo todos vocês!

Obrigado aos meus mestres professores da universidade! Em especial ao professor Rinaldo Mota e ao professor Wilton Junior por me orientarem na vida e nos estudos, e também pela confiança ao ceder espaço no laboratório assim como material para trabalhar! Tenho uma consideração enorme por todo conhecimento compartilhado por vocês, sois grandiosos exemplos de professores.

Obrigado aos meus muitos amigos e colegas de trabalho da universidade... vocês foram cruciais para realização desta pesquisa. São tantas graças a Deus que fico com medo de cometer a injustiça de esquecer de citar algum de vocês aqui, portanto, vou me segurar para não começar a citá-los... mas saibam que vocês sempre estarão em meu coração.

Obrigado aos animais, sem vocês não há vida.

Obrigado à Universidade Federal Rural de Pernambuco, aos Departamentos de Morfologia e Fisiologia Animal e de Medicina Veterinária, ao programa de Pós-Graduação em Biociência Animal e aos seus respectivos professores, técnicos e gestores por tornar essa instituição um exemplo na educação e também um segundo lar.

Obrigado aos colegas de outras instituições pela confiança e parceria.

## Sumário

1. Introdução.....	12
2. Revisão de Literatura .....	14
2.1. Etiologia.....	14
2.1.1. Histórico da identificação das cepas de MAP .....	15
2.1.2. Diferenças fenotípicas entre as cepas de MAP.....	17
2.2. Epidemiologia .....	17
2.2.1. Comparações epidemiológicas entre as cepas de MAP.....	21
2.3. Patogenia e sinais clínicos .....	22
2.3.1. Virulência e patogenicidade das cepas de MAP.....	25
2.4. Métodos de diagnóstico da Paratuberculose .....	26
2.5. Saúde Pública.....	28
2. Objetivos .....	31
2.1. Objetivo geral .....	31
2.2. Objetivos específicos .....	31
3. Referências .....	32
4. Artigos Científicos .....	52
4.1. Artigo 1 .....	52
4.2. Artigo 2 .....	67
4.3. Artigo 3 .....	77
5. Considerações Finais.....	87

## LISTA DE FIGURAS

- Artigo 1**  
**Figura 1** A – Resultado da PCR para região IS1311: MM – Marcador molecular de 100pb; 01, 04, 05, 08, 09 – Amostras positivas na reação, na altura de 608pb; 02, 03, 06, 07 – Amostras negativas na reação. B – Resultado da análise com enzimas de restrição (HinfI e MseI) do produto da PCR para região IS1311: MM – Marcador molecular; 01-13 resultado da digestão enzimática de várias amostras, resultando em três fragmentos nas alturas de 67pb, 218pb e 323pb, sendo caracterizadas como pertencentes ao tipo *Cattle*, subtipo *Bison*. 57
- Artigo 1**  
**Figura 2** Distribuição geográfica das amostras analisadas e positivas na PCR para a região IS900 do MAP e resultado da tipificação por REA. 57
- Artigo 2**  
**Figura 2** A - Percentual de amostras positivas para a região IS900 de MAP; B – Quantificação das UFC de MAP em cada amostra de queijo positiva. 70



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Relatos da ocorrência de infecção por MAP em bovinos no território brasileiro a partir do ano 2000.	18
<b>Tabela 2</b>	Relatos da ocorrência de infecção pelo MAP em búfalos no território brasileiro.	19
<b>Tabela 3</b>	Relatos da detecção de MAP em amostras de leite, queijo, leite em pó e carnes no mundo.	30
<b>Artigo 1 Tabela 1</b>	Tamanhos de bandas esperadas logo após a digestão pelas enzimas de restrição (HinfI e MseI) do produto de PCR da região IS1311.	56
<b>Artigo 3 Tabela 1</b>	Tamanhos de bandas esperadas logo após a digestão pelas enzimas de restrição (HinfI e MseI) do produto de PCR da região IS1311.	80

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

- BAAR – Bacilos Álcool Ácidos Resistentes
- ELISA - Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
- GALT - Tecido Linfoide Associado ao Intestino
- HEYM - Herrold's egg Yolk Medium
- IDGA - Imunodifusão em Gel de Ágar
- MAP – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- pH - potencial hidrogeniônico
- qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
- REA - Análise de Restrição Enzimática
- RFLP - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação

## RESUMO

Paratuberculose é uma doença de grande impacto econômico mundial e incurável nos ruminantes, causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Também existe a suspeita do envolvimento desta bactéria com enfermidades nos humanos como a Doença de Crohn. Objetivou-se nesta pesquisa realizar um estudo de epidemiologia molecular de MAP em rebanhos bovinos, bubalinos e em amostras de queijo tipo coalho destas espécies. Foram coletadas 109 amostras de fezes e tecidos de bovinos e bubalinos com suspeita de paratuberculose. 25 amostras foram positivas na detecção do DNA da região IS900 de MAP e foi possível tipificar 18 cepas na análise da região IS1311, sendo 100% delas identificadas como do tipo *Cattle* subtipo *Bison*. Ainda foram analisadas quarenta amostras de queijo tipo coalho artesanal produzido com leite bovino para detecção de DNA de MAP por meio da técnica da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para detecção da região IS900 do MAP, sendo 11/40 (27,5%) positivas. Também foram analisadas duas amostras de queijo tipo coalho de leite de búfala para isolamento e tipificação de MAP, sendo uma delas positiva no cultivo e PCR e tipificada como pertencente ao tipo *Cattle* subtipo *Bison*. Os resultados deste estudo fortalecem os dados sobre a disseminação de MAP em algumas regiões do Brasil em bovinos e bubalinos e identifica de forma inédita, a ocorrência da cepa tipo *Cattle* subtipo *Bison* de MAP nestas espécies no país. Ainda, registra-se a ocorrência do DNA de MAP em queijo tipo coalho produzido com leite de vaca e a ocorrência de MAP viável em queijo tipo coalho de búfala na região nordeste do Brasil. Os resultados obtidos neste estudo dão o suporte para a implementação de estratégias de controle da paratuberculose no país.

## ABSTRACT

Paratuberculosis is a worldwide disease of great economic impact and incurable in ruminants, caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). There is also suspicion of the involvement of this bacterium with diseases in humans such as Crohn's disease. The objective of this research was to conduct a study of molecular epidemiology of MAP in cattle herds, buffalo and coalho cheese samples from those species. A total of 109 samples of feces and tissues from bovines and buffalos suspected of paratuberculosis were collected. 25 samples were positive in the detection of the DNA of the IS900 region of MAP and it was possible to type 18 strains in the analysis of the region IS1311, being 100% of them identified as type Cattle subtype Bison. Forty samples of artisanal coalho cheese produced with bovine milk were analyzed for MAP DNA detection by the Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) technique for detection of the MAP region IS900, from those, 11/40 (27.5%) were positive. Also, two samples of coalho cheese produced with buffalo milk were analyzed for isolation and typing of MAP, one of which was positive in culture and PCR and typified as belonging to type Cattle subtype Bison. The results of this study strengthen the data about MAP dissemination in some regions of Brazil in cattle and buffaloes and of an unprecedented way identifies the occurrence of subtype Bison strain of MAP in these species in the country. The occurrence of MAP DNA in coalho cheese produced with cow's milk and the occurrence of viable MAP in buffalo coalho cheese in the northeast region of Brazil is also recorded. The results obtained in this study support the implementation of paratuberculosis control strategies in the country.

## 1. Introdução

A pecuária bovina do Brasil possui grande importância econômica para o país por deter o segundo maior rebanho de bovinos e ser o maior exportador mundial de carne bovina (DIAS-FILHO, 2016). E, apesar da bubalinocultura ser uma atividade menos desenvolvida, nas últimas décadas esta ganhou destaque no cenário nacional, deixando de ser apenas uma alternativa para a ocupação de terras impróprias à criação de bovinos e passando a ser uma opção economicamente rentável (SILVA et al., 2014).

Segundo o IBGE (2015), estima-se que no Brasil existem aproximadamente 215.199.488 cabeças de gado bovino; desse total, a maior parte encontra-se na região Centro-Oeste (33,78%), seguido da região Norte (21,91%), Sudeste (18,03%), Nordeste (13,51%) e Sul (12,78%). Com relação à espécie bubalina, estima-se que o Brasil possua cerca de 1.365.636 cabeças, sendo que a grande maioria pertence à região Norte (66,2%), seguido do Sudeste (12,40%), Nordeste (9,52%), Sul (7,45%) e Centro-Oeste (4,35%).

Apesar das semelhanças zootécnicas entre bubalinos e bovinos, existem algumas peculiaridades que devem ser consideradas quanto à sanidade dos animais. De uma maneira geral, os bubalinos podem ser acometidos pelas mesmas enfermidades que os bovinos, porém, os búfalos podem apresentar maior resistência a algumas enfermidades comuns aos demais ruminantes (RODRIGUES et al., 2008; BATISTA; PACHECO; VIEDO, 2016).

Porém, uma importante enfermidade que acomete as duas espécies é a paratuberculose, também conhecida por Doença de Johne, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP). Esta doença causa uma diarreia crônica e intermitente nessas espécies que leva o animal a uma perda progressiva de peso, diminuição na produção do leite e, posteriormente, à morte (DRIEMEIER et al., 1999; MANNING; COLLINS, 2001; MOTA et al., 2010).

Essa enfermidade é responsável por causar sérios prejuízos, pois, propriedades com animais positivos podem ter perdas econômicas provocadas pela queda da produção de leite, gastos com medicamentos e também aumento de gastos com animais de reposição (BENEDICTUS; DIJKHUIZEN; STELWAGEN, 1987; OTT; WELLS; WAGNER, 1999).

No Brasil, apesar da paratuberculose ser uma enfermidade emergente e que já foi relatada em 12 estados da Federação, ainda é negligenciada pelos órgãos de controle e fiscalização, sendo de extrema importância a implementação de medidas de controle sanitário para a enfermidade no país, o que possibilitaria a melhoria da qualidade e valorização dos produtos de origem animal no mercado internacional (YAMASAKI et al., 2013b; BRITO et al., 2016).

Estratégias de controle podem ser melhoradas com a identificação da cepa de MAP circulante (MOTIWALA et al., 2006a). E para identificação das cepas, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de uma Análise de Restrição Enzimática (REA) da região IS1311 do MAP permite uma rápida diferenciação entre os tipos *Cattle*, *Sheep* e subtipo *Bison* (MARSH; WHITTINGTON; COUSINS, 1999; WHITTINGTON et al., 2001; WHITTINGTON; MARSH; WHITLOCK, 2001).

Vale ressaltar que o MAP pode estar envolvido na doença inflamatória intestinal humana (doença de Crohn), hipótese essa levantada há um século (DALZIEL, 1913) e que permanece até os dias atuais (ROBERTSON et al., 2017).

A identificação da cepa é uma ferramenta promissora na investigação epidemiológica na obtenção de uma melhor compreensão da origem da infecção, identificação de fatores de risco que influenciam a transmissão, caracterização da patogênese e avaliação de programas de controle existentes (MOTIWALA et al., 2006b).

Devido a essa preocupação, muitas pesquisas têm sido realizadas relatando o MAP em diversos tipos de alimentos, como, por exemplo, na carne (ALONSO-HEARN et al., 2009), leite pasteurizado (GRANT; BALL; ROWE, 2002), fórmula infantil (HRUSKA et al., 2011) e queijos (STEPHAN et al., 2007).

Diante do exposto, objetivou-se a realização de um estudo sobre a epidemiologia molecular da paratuberculose em rebanhos bovinos, bubalinos e amostras de queijo tipo coalho destas espécies.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Etiologia

A paratuberculose é uma enfermidade infectocontagiosa dos animais domésticos que cursa com uma inflamação intestinal incurável crônica, principalmente nos ruminantes. É causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), um bacilo álcool ácido resistente (KENNEDY; BENEDICTUS, 2001). Esse microrganismo pertencente à família *Mycobacteriaceae*, tem um crescimento lento e é um patógeno intracelular que possui uma parede rica em lipídeos (HARRIS; BARLETTA, 2001; MANNING; COLLINS, 2001).

As micobactérias são resistentes a fatores químicos e físicos. O MAP encontra-se entre uma das espécies mais resistentes desse gênero e isso explica a habilidade que esse microrganismo tem de persistir no ambiente. Estudos indicam que o MAP mantido ao ar livre nas fezes pode sobreviver entre 152 e 246 dias, dependendo das condições e que, aparentemente, os solos secos diminuem o período de vida desse microrganismo. Então, levando em conta a longevidade do MAP, os pastos podem permanecer contaminados por pelo menos um ano (LOVELL; LEVI; FRANCIS, 1944). Fatores que podem encurtar o tempo de sobrevivência desta bactéria são: exposição à luz solar, pH acima de 7,0 e baixo teor de ferro (LARSEN; MERKAL; VARDAMAN, 1956; JOHNSON-IFEARULUNDU; KANEENE, 1999).

Uma característica importante na epidemiologia desse microrganismo é que sua resistência ao cloro pode aumentar a sua capacidade de contaminar e sobreviver em sistemas de água (MANNING; COLLINS, 2001; WHAN et al., 2001). Foi relatado também que o MAP possui a capacidade de esporular, obtendo assim, maior resistência a fatores físico-químicos, entretanto, os autores afirmam que ainda não se conhece claramente o mecanismo pelo qual as micobactérias manifestam esse estado (LAMONT et al., 2012).

Com o advento e evolução das técnicas moleculares, uma importante região do genoma pertencente ao MAP foi anunciada. Essa sequência de nucleotídeos no DNA cromossômico foi descoberta, simultaneamente, em dois laboratórios, sendo denominado de elemento de inserção "IS900", presente no MAP de 15 a 18 cópias. Este foi o primeiro elemento de inserção relatada em micobactérias (COLLINS; GABRIC;

DE LISLE, 1989; GREEN et al., 1989). Outra sequência, utilizada no diagnóstico da doença de Johne, é a F57, uma sequência única e específica do MAP que possui 620 pares de bases (POUPART et al., 1993). A *ISMav2* é considerado um elemento de inserção que pode ser encontrado no MAP e não possui nenhuma similaridade com elementos pertencentes a outras micobactérias; esta região foi considerada como uma ótima ferramenta para o diagnóstico do MAP (STROMMINGER; STEVENSON; GERLACH, 2001).

Outra importante região de inserção do genoma do MAP é a IS1311, que embora tenha sido demonstrada tanto em MAP quanto em *Mycobacterium avium*, mutações em cinco pontos da IS1311 diferenciam a sequência entre as duas espécies. Essas mutações pontuais podem ser direcionadas pela análise de restrição enzimática (REA) para diferenciar MAP de *Mycobacterium avium*. Além disso, algumas cópias do IS1311 da cepa tipo *Cattle* de MAP contêm um ponto adicional de mutação que pode ser utilizado para diferenciação da cepa tipo *Sheep* (WHITTINGTON et al., 1998).

### **2.1.1. Histórico da identificação das cepas de MAP**

A capacidade de diferenciar estirpes do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) era extremamente limitada. Houve relatos de cepa pigmentada e não pigmentada de MAP em ovelhas e evidência *in vitro* que as cepas que frequentemente infectavam ovelhas eram diferentes daquelas que infectavam a espécie bovina (TAYLOR, 1951).

Entretanto, essas diferenças não foram suficientes para determinar a estabilidade genética ou distribuição geográfica. Até o advento das técnicas de detecção de DNA não era possível caracterizar de forma confiável as cepas de MAP. Como a caracterização das estirpes eram muito úteis para responder a uma série de questões epidemiológicas, a ausência de tal técnica limitou os estudos epidemiológicos sobre a paratuberculose (STEVENSON, 2010).

O primeiro sistema de tipificação de DNA aplicado às cepas MAP foi a Análise de Restrição Enzimática (REA) onde os pesquisadores puderam analisar semelhanças e diferenças entre três cepas referenciadas à época. Nesta técnica, o DNA genômico purificado de uma estirpe selecionada é digerido com uma endonuclease de restrição e



os fragmentos produzidos são separados com base no tamanho por eletroforese em gel de agarose (COLLINS; De LISLE, 1986).

Posteriormente, a REA foi aplicada a uma coleção diversa de 50 cepas de MAP de uma variedade de espécies hospedeiras provenientes de cinco países; as cepas foram separadas em dois grupos: aquelas isoladas predominantemente de bovinos que formaram o grupo tipo *cattle* (Tipo C) e as cepas isoladas predominantemente de ovelhas que formaram um segundo grupo, o tipo *sheep* (Tipo S). Isto estabeleceu pela primeira vez uma base genética baseada em grande parte em características de cultura *in vitro* onde muitos isolados de ovelhas se mostraram diferentes dos isolados de bovinos (COLLINS; GABRIC; DE LISLE, 1990a).

Ainda, com o advento das técnicas de tipagem molecular foi possível discriminar geneticamente entre os isolados de MAP outros tipos de cepas como, por exemplo, a do tipo “*Intermediária*” identificada com a técnica molecular de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação (RFLP) (COLLINS; GABRIC; DE LISLE, 1990a). Do mesmo modo, uma cepa do tipo *bison* (tipo B) foi descrita devido à identificação de uma pequena sequência distinta de polimorfismo na sequência do genoma de MAP (WHITTINGTON; MARSH; WHITLOCK, 2001). Em seguida, outras análises revelaram que os isolados do tipo B de animais da Índia eram diferentes dos isolados do tipo B dos EUA e os da Índia passaram a ser conhecidos como *Indian Bison Type* (SEVILLA et al., 2005). Vale ressaltar que o uso dos termos tipo *Cattle* e *Sheep* não implicaram na especificidade absoluta de hospedeiro, uma vez que ambos os tipos foram isolados, pelo menos ocasionalmente, de todos os hospedeiros ruminantes, mas esta designação tem utilidade epidemiológica em algumas situações (WHITTINGTON et al., 2000).

Estudos recentes de comparação do genoma de MAP ratificaram a divisão de isolados de MAP em dois principais tipos: as cepas *Sheep* e *Cattle*. Em um dos estudos é relatado que, após a análise do genoma não houve distinções que delineassem uma terceira maior linhagem (tipo Intermediário ou III), de modo que os autores agruparam as cepas de Tipo III como uma sub linhagem do tipo *Sheep* (ALEXANDER; TURENNE; BEHR, 2009). As cepas do tipo *Bison* também acabaram sendo classificadas como uma sub linhagem do tipo *Cattle* (THIBAUT et al., 2012).

Sabe-se que existem pelo menos duas e talvez outras diferentes linhagens de MAP que são capazes de causar paratuberculose em vários hospedeiros. A verdadeira diversidade dos isolados de MAP só será identificada quando métodos de cultura adequados juntamente com genotipagem apropriada forem aplicados às coleções abrangentes e representativas desta bactéria (STEVENSON, 2010).

### **2.1.2. Diferenças fenotípicas entre as cepas de MAP**

Os tipos de cepas de MAP diferem em relação à facilidade com a qual podem ser isoladas em meios artificiais e suas respectivas taxas de crescimento. As cepas do tipo *Cattle* são comparativamente fáceis de serem isoladas a partir de amostras clínicas e crescem razoavelmente bem em uma variedade de meios sólidos ou líquidos suplementados com micobactina J. Essas cepas geralmente apresentam crescimento detectável em 4 a 16 semanas. Já as cepas do tipo *Sheep* normalmente crescem mais lentamente e têm requisitos exigentes de cultura e o seu isolamento primário pode levar de 4 meses até um ano (STEVENSON, 2010).

Os meios sólidos mais recomendados para o isolamento de estirpes do tipo *Sheep* são o Löwenstein-Jensen e Middlebrook 7H11, ambos suplementados com a micobactina J (DE JUAN et al., 2006). Vale ressaltar que as cepas tipo *Sheep*, além da grande dificuldade para seu crescimento em meios de cultura, também são altamente sensíveis aos procedimentos de descontaminação e a certos antibióticos como a ampicilina ou cloridrato de vancomicina (REDDACLIFF; VADALI; WHITTINGTON, 2003; GUMBER; WHITTINGTON, 2007; WHITTINGTON, 2009).

## **2.2. Epidemiologia**

MAP pode causar enfermidade em várias espécies de animais, acometendo principalmente os ruminantes e outras espécies como os cães (GLANEMANN et al., 2008), suínos (MORAVKOVA et al., 2007) e primatas (MCCLURE et al., 1987).

No Brasil, o primeiro relato da paratuberculose foi feito no Rio de Janeiro em 1915 pelo professor Otávio Dupont (DUPONT, 1915) em bovinos importados da Bélgica e, até o ano de 1999 foram relatados outros casos de paratuberculose no território brasileiro: Rio de Janeiro (SANTOS; SILVA, 1956), Rio Grande do Sul (RAMOS et al., 1986; DRIEMEIER et al., 1999), Minas Gerais (NAKAJIMA; MAIA;

MOTA, 1991), Santa Catarina (PORTUGAL et al., 1979) e Mato Grosso de Sul (BRAUTINGAM; GLASS; MENDY, 1996). A partir do ano 2000, vários casos de paratuberculose em bovinos foram diagnosticados por diferentes técnicas laboratoriais no Brasil (Tabela 1).

**Tabela 1:** Relatos da ocorrência de infecção por MAP em bovinos no território brasileiro a partir do ano 2000.

<b>Autores</b>	<b>Ano</b>	<b>Estado</b>	<b>Método de Diagnóstico</b>	<b>Porcentagem de positivos</b>
Fonseca et al.	2000	São Paulo	ELISA	37,9%
Ferreira; Fonseca; Lilenbaum	2001	Rio de Janeiro	ELISA	18%
Gomes et al.	2002	Rio Grande do Sul	ELISA IDGA	39,8% 11,4%
Cunha et al.	2003	Goiás	Exames clínicos e anátomo-histopatológicos	Relato de caso
Silva	2005	Pará	ELISA	35,4%
Acypreste et al.	2005	Goiás	ELISA	60,24%
Mota et al.	2007	Pernambuco	ELISA Isolamento de MAP presente nas fezes	32,3% 50%
Carvalho	2008	Minas Gerais	Isolamento ELISA PCR IS900 PCR ISMav2 Sequenciamento	Ocorrência estimada de 3,6%
Mota et al.	2009	Paraíba	Exames clínicos e anátomo-histopatológicos e isolamento em HEYM	1,25%
Costa et al.	2010	Espírito Santo	ELISA (11,4% de amostras positivas)	11,4%
Yamasaki et al.	2010	Rio de Janeiro	ELISA Isolamento PCR IS900 Anátomo-histopatológicos	40% 7% 33%
Medeiros et al.	2012	Paraíba	ELISA (Propriedades com	70,6%

			histórico)	
			ELISA (Propriedades sem histórico)	10,08%
Sá et al.	2013	Pernambuco	ELISA	2,7%
Yamasaki et al.	2013	Rio de Janeiro	Imunohistoquímica	11,53%
			Exames clínicos e anátomo-histopatológicos	
Fiss et al.	2015	Rio Grande do Sul	qPCR	14,70%
			Exames clínicos e anátomo-histopatológicos	

(ALBUQUERQUE, 2018)

No Brasil, apesar da bubalinocultura ter destaque econômico em determinadas regiões do país, a paratuberculose só foi descrita recentemente nesta espécie por MOTA et al. (2010) em Pernambuco, onde os autores relataram queixas de doença intestinal que cursava com diarreia crônica, perda de peso e queda nos níveis de produção de leite e carne em algumas propriedades de exploração leiteira de alguns Estados da região nordeste do país. Levantaram a hipótese de que esta enfermidade poderia estar ocorrendo em outros estados da região e, desde então, outros relatos dessa enfermidade têm surgido nesta espécie (Tabela 2).

**Tabela 2:** Relatos da ocorrência de infecção pelo MAP em búfalos no território brasileiro.

<b>Autores</b>	<b>Ano</b>	<b>Estado</b>	<b>Método de Diagnóstico</b>	<b>Porcentagem de positivos</b>
Mota et al.	2010	Pernambuco	Exame clínico e anátomo-histopatológico	Relato de caso
			PCR	
Dalto et al.	2012	Maranhão	ELISA	19,58% (28/143)
Reis et al.	2015	Maranhão	Ziehl-Neelsen	4,3% (6/140)
			qPCR	5,71% (7/140)
Reis et al.	2016	Maranhão	qPCR	53,84% (7/13)
Brito et al.	2016	Alagoas	Exames clínico e anátomo-histopatológico	Identificado foco em 1 (1,42%) rebanho de 70
			Imunohistoquímica	

			PCR	estudados
Brito et al.	2016	Maranhão	Exames clínico e anátomo-histopatológico Imunohistoquímica PCR	Identificado foco em 5 (7,14%) rebanhos de 70 estudados

---

(ALBUQUERQUE, 2018)

A transmissão da bactéria da paratuberculose pode ocorrer primariamente pela ingestão de alimentos e água contaminados por fezes e amamentação (via tetos contaminados e/ou eliminação direta do microrganismo por meio do leite ou colostro). Vacas infectadas e, provavelmente outras espécies, podem eliminar o MAP diretamente no leite até os estágios finais da infecção (SWEENEY; WHITLOCK; ROSENBERGER, 1992; STREETER et al., 1995; MANNING; COLLINS, 2001).

Já foi constatada a transmissão da mãe para o feto. Este tipo de transmissão pode ocorrer nos estágios finais da doença e, talvez, mesmo nas fases pré-clínicas de doença (WHITTINGTON; WINDSOR, 2009). A presença de MAP também já foi relatada em amostras de sêmen e sangue de bovinos naturalmente infectados por meio de técnicas moleculares (MUNSTER et al., 2013).

MAP é um patógeno obrigatório de animais e o único sítio onde se multiplica é no hospedeiro suscetível. No ambiente pode sobreviver por longos períodos de tempo no solo e na água, mas é incapaz de se multiplicar fora do hospedeiro. Consequentemente, a principal fonte de infecção de MAP é o animal infectado (COLLINS, 2003).

Por meio da inoculação experimental foi observado que os animais mais jovens (1,6 a 3 anos) apresentaram uma frequência mais elevada da infecção quando comparados com animais mais velhos (acima de 8 anos). Ainda foi possível observar uma maior eliminação do microrganismo nas fezes pelos animais em idade reprodutiva (HASONOVA et al., 2009).

Os animais mais jovens necessitam de uma carga infecciosa menor quando comparados aos animais mais velhos. Animais adultos são mais resistentes à infecção, mas se tornam suscetíveis, caso haja uma elevada contaminação ambiental (MCKENNA et al., 2006). Leite cru de vaca tem sido um foco de vigilância, pois é reconhecido como um fator importante na transmissão de MAP da vaca para o bezerro.

Resultados de um estudo demonstraram que a fonte de leite e colostro podem ser fatores de risco para a infecção em bovinos (NIELSEN; BJERRE; TOFT, 2008).

Condições predisponentes para a infecção incluem a falta de higiene que expõe os bezerros às fezes de animais mais velhos, ao leite contaminado e, também, a uma alimentação inadequada, além da baixa condição corporal. Em bovinos, a idade do animal, a resistência da raça, a suscetibilidade genética e outras doenças têm sido apontados como fatores de risco para o desenvolvimento da paratuberculose (RADOSTITS; GAY; HINCHCLIFF, 2007).

### **2.2.1. Comparações epidemiológicas entre as cepas de MAP**

Em relação às espécies acometidas, as cepas tipo *Sheep* foram isoladas principalmente, mas não exclusivamente, de ovinos e caprinos, sugerindo uma certa predileção por essas espécies hospedeiras. Estão incluídas as cepas tipo *Sheep* pigmentadas que foram isoladas e relatadas em ovinos e caprinos na Espanha (SEVILLA et al., 2007) e Marrocos (BENZAZZI; EL HAMIDI; SCHLIESSER, 1996). Também as cepas do tipo *Sheep* não pigmentadas, como, por exemplo, a que foi relatada por Travería et al. (2013), acometendo ovinos na Argentina. Acredita-se, ainda, que o risco de transmissão natural de cepas do tipo *Sheep* de ovelhas e cabras para bovinos seja baixo e provavelmente só ocorre quando os animais suscetíveis são expostos a altas doses infectantes. Um estudo experimental realizado por Moloney e Whittington (2008) estimou que a prevalência de infecções em bovinos australianos expostos à cepa do tipo *Sheep* foi inferior a 0,8%.

Já as cepas do tipo *Cattle* não demonstraram predileção de hospedeiro e podem ser isoladas de uma ampla variedade de espécies selvagens e domésticas, cativas e de vida livre, incluindo os não ruminantes (GHADIALI et al., 2004; MOTIWALA et al., 2004; HUTCHINGS et al., 2010). Porém, vale ressaltar que esta é a cepa predominantemente isolada de bovinos. O subtipo *Bison* também não se restringem às espécies de Bisões e foram isolados de muitas espécies domésticas (SEVILLA et al., 2005; KUMAR et al., 2008; YADAV et al., 2008; SINGH et al., 2009) e de vida selvagem e humanos (SINGH et al., 2009). Também há evidências para uma maior taxa de transmissão entre espécies submetidas às cepas do tipo *Cattle*, pois, a mesma cepa foi encontrada infectando espécies selvagens e ruminantes domésticos em uma mesma propriedade (STEVENSON et al., 2009; FRITSCH et al., 2012) e a infecção entre duas

espécies de ruminantes criadas na mesma propriedade (STEVENSON et al., 2009; DIMARELI-MALLI et al., 2013).

A transmissão de MAP também depende da capacidade de sua sobrevivência no ambiente, porém, são escassos os trabalhos que investigam a resistência ambiental das diferentes cepas desta bactéria. Um estudo realizado por Eppleston et al. (2014) relatou que a taxa de mortalidade da cepa tipo *Sheep* foi 2,3 vezes maior em locais de zonas áridas em comparação com zonas temperadas na Austrália, enquanto que a cepa *Cattle* não foi muito afetada pelas condições ambientais.

### **2.3. Patogenia e sinais clínicos**

A principal porta de entrada do MAP em ruminantes é a digestiva, de modo que a absorção pelas superfícies da mucosa é o primeiro passo do processo infeccioso que ocorre no Tecido Linfóide Associado ao Intestino (GALT), que em ruminantes é organizado em agregados linfóides conhecidos por Placas de Peyer (BEHR; COLLINS, 2010). As células M presentes nas Placas de Peyer realizam a pinocitose da bactéria seguido de transcitose que posteriormente serão fagocitados por macrófagos ou células dendríticas (DC) na superfície basolateral (MOMOTANI et al., 1988). Uma vez que a fagocitose é realizada, as células com o MAP são transportadas para outras áreas do corpo, incluindo a lâmina própria do intestino delgado, os nódulos linfáticos mesentéricos e a circulação periférica (LUGTON, 1999).

Após a fagocitose, o MAP pode permanecer intacto, evadindo os mecanismos bactericidas da célula apresentadora de antígeno (APC), ou pode ser processado e apresentado aos linfócitos T, gerando um efeito em cascata de resposta imunológica. A resposta antigênica leva a formação de células epitelióides e células gigantes, caracterizando o granuloma. E por se tratar de uma bactéria intracelular, esta é capaz de sobreviver dentro de macrófagos, inibindo a maturação do fagossoma e ocorrendo multiplicação da micobactéria com aumento do volume celular. Em um passo seguinte ocorre a morte dos macrófagos e liberação das bactérias, que, novamente são fagocitadas provocando um aumento no número de macrófagos carregados de bactérias nas vilosidades intestinais e, posteriormente, nas camadas mais profundas da lâmina própria, causando aumento de volume das vilosidades. A lâmina própria desagrega-se e em parte é destruída (SEFFNER, 1988; BEHR; COLLINS, 2010).

A medida em que o agente se multiplica por semanas ou meses, o intestino espessado torna-se menos hábil na absorção de nutrientes e conseqüentemente o animal perde peso apesar de apresentar apetite normal. A parede intestinal espessada começa, gradativamente a perder eletrólitos do sangue para o intestino e a hipoproteinemia resulta da má absorção e da enteropatia com perda proteica (SMITH, 2010).

Após a exposição inicial ao MAP, há uma resposta adequada das células T caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias como o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e as interleucinas IL-1 $\alpha$ , IL-2 $\alpha$  e IL-6 $\alpha$  (COUSSENS, 2001). Pelo fato da bactéria ser amplamente restrita ao crescimento no interior dos macrófagos, as respostas pró-inflamatórias e citotóxicas são essenciais para o controle da infecção. No entanto, durante a fase subclínica tardia da paratuberculose, a resposta pró-inflamatória do tipo TH1 é muitas vezes atenuada ou perdida. Então, na doença de fase tardia, uma resposta do tipo TH2, caracterizada pela produção de imunoglobulinas G1 (IgG1) predomina e esta mudança na resposta imune predominante está associada à progressão da doença clínica (STABEL, 2000; COUSSENS, 2001). A resposta de IgG1 pode ser desenvolvida a qualquer momento a depender da dose infectante do microrganismo e da porta de entrada. Essa resposta é praticamente o que resta depois que as células pró-inflamatórias e supressoras começam a perder o equilíbrio. À medida que a infecção avança e as células pró-inflamatórias são esgotadas, a resposta imune externa predominante seria a produção de imunoglobulinas. Então, é neste momento que a infecção pode ser classificada como clínica e terminal (COUSSENS, 2004).

A paratuberculose em bovinos é caracterizada por um quadro clínico de diarreia crônica, profusa e refratária ao tratamento com antibióticos. Hipoproteinemia e edema submandibular também são relatados em casos avançados da enfermidade. Os animais ainda podem se tornar caquéticos e fracos, levando-os à morte (DRIEMEIER et al., 1999; OTT; WELLS; WAGNER, 1999; MANNING; COLLINS, 2001; MOTA et al., 2007).

A infecção por MAP é dividida em quatro estágios clínicos e, de acordo com a severidade dos sinais clínicos, ocorre a eliminação do agente no meio ambiente (BEHR; COLLINS, 2010).

O estágio I possui como característica uma infecção silenciosa onde o MAP se multiplica lentamente na mucosa intestinal (jejuno e íleo) e posteriormente é carregado



aos linfonodos regionais (CLARKE, 1997). Bovinos infectados no estágio I podem disseminar MAP no ambiente pelas fezes, mas normalmente está abaixo dos níveis de detecção por métodos de diagnóstico, incluindo a cultura e a PCR. Caso aconteça a coleta das amostras desses animais, o agente pode ser ocasionalmente detectado em concentrações baixas nas fezes (WATERS et al., 2003; BEHR; COLLINS, 2010).

O estágio II, também conhecido por “infecção subclínica” tem como característica uma concentração mais elevada de MAP na mucosa intestinal, mas esses animais não apresentam perda de peso ou diarreia e têm uma resposta imune maior com aumento nos títulos de anticorpos contra o MAP. Nessa fase, já é possível a detecção de MAP nas fezes por meio dos testes convencionais de diagnóstico. De certa forma, os animais nesse estágio contribuem para a disseminação da bactéria, contaminando assim o ambiente, e pode ser considerado como fonte de infecção para os outros animais do rebanho (BASSEY; COLLINS, 1997; BEHR; COLLINS, 2010).

No estágio III, os animais já apresentam a forma clínica da doença, caracterizada por perda de peso gradual e diarreia. A localização intracelular de MAP na mucosa intestinal é muito elevada e a capacidade de absorção está bastante reduzida, ocasionando uma enteropatia com perda de proteínas. Os sinais vitais como frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura apresentam-se normais. Há também uma diminuição na produção de leite. Nessa fase, quase todos os animais são positivos para os testes de diagnóstico (BEHR; COLLINS, 2010).

O estágio IV é o mais avançado e corresponde à fase em que os animais estão fracos, caquéticos e, geralmente, têm diarreia profusa crônica. Edema submandibular é característico desta fase da doença. A maioria dos animais é enviada ao abate nesta fase. Caso contrário, a morte ocorre como um resultado da desidratação e caquexia (BEHR; COLLINS, 2010).

Muitas lesões podem ser observadas na necropsia, dependendo da fase da infecção e das espécies em questão. As lesões clássicas, descritas em bovinos e bubalinos, incluem um íleo ondulado e espessado, com gânglios linfáticos mesentéricos edematosos e aumentados de volume e linfangiectasia. As principais lesões microscópicas incluem enterite, linfadenite e linfangite granulomatosa que se caracterizam por infiltrado inflamatório composto por macrófagos, células epitelióides e

células gigantes de Langhans com presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BUERGELT et al., 1978; DRIEMEIER et al., 1999; MOTA et al., 2007, 2010).

### **2.3.1. Virulência e patogenicidade das cepas de MAP**

Evidências indicam que as cepas de MAP diferem em virulência e podem estar associadas a diferentes formas imunopatológicas da doença. Um fator determinante da virulência é a capacidade do MAP infectar e se multiplicar no interior das células logo após adentrar a superfície do epitélio intestinal (STEVENSON, 2010).

Uma pesquisa realizada na espécie bovina por Janagama et al. (2006) revelou que as cepas tipo *Cattle* foram encontradas em número relativamente maior em macrófagos quando comparadas com um isolado tipo *Sheep*. Outro estudo experimental realizado em cervos utilizando um isolado do tipo *Cattle* estabeleceu infecção em 100% dos animais, em contrapartida, a taxa de infecção foi de 69% com a mesma dose de uma estirpe do tipo *Sheep* foi usada nesta espécie, sugerindo que as cepas deste último podem ser menos virulentas para esta espécie (O'BRIEN et al., 2006).

Estudos indicam que diferentes cepas podem desempenhar papéis diferentes na resposta imune do hospedeiro, o que pode determinar as diferenças patológicas observadas nesta enfermidade. Janagama et al. (2006) investigaram respostas de citocinas às diferentes cepas de MAP em um sistema de Macrófagos Derivados de Monócitos (MDM) de bovinos; os resultados sugerem que os isolados de bovinos (B1018) e humanos (Hu6) induzem as vias anti-inflamatórias nos macrófagos, enquanto que o isolado de ovino (S7565) induz uma via pró-inflamatória.

Motiwala et al. (2006a) realizaram um estudo semelhante, porém, utilizaram uma linhagem de células de monócitos de humanos com diferentes cepas. Os resultados da pesquisa sugerem que as respostas dos macrófagos ao MAP de bovino e humano independentemente do genótipo provocam respostas anti-inflamatórias comuns, um atributo provavelmente associado a uma bem sucedida infecção e persistência no hospedeiro. Já estes padrões de expressão diferiram significativamente daqueles monócitos infectados com isolados de ovino. Os autores relataram que embora os níveis de expressão induzidos pelo isolado do subtipo *Bison* fossem diferentes em comparação com os isolados de bovinos e humanos, estes seguiram de forma semelhante a via anti-inflamatória e anti-apoptótica.

Também foi verificado que a infecção com isolados tipo *Cattle* de diferentes genótipos resultou em um padrão comum caracterizado por lesões focais, principalmente nos linfonodos mesentéricos, bem como a presença de tecido fibroso e ocasionalmente necrose e numerosas células gigantes de Langhans nos granulomas. Já a infecção pelo tipo *Sheep* induziu lesões mais graves ocorrendo principalmente no tecido linfático intestinal; neste caso não foram observadas necrose, fibrose e células gigantes. Verificou-se, ainda, que as lesões induzidas pelo tipo *Sheep* foram mais severas do que as induzidas por cepas tipo *Cattle*, sugerindo que esta última possui um desenvolvimento lento e localizado nos estágios iniciais da infecção (VERNA et al., 2007).

#### **2.4. Métodos de diagnóstico da Paratuberculose**

Para detecção dos bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) podem ser utilizados métodos de coloração como a de Ziehl-Neelsen, sendo possível a observação desse microrganismo em amostras de fezes ou tecidos (MANNING; COLLINS, 2001).

A infecção nos estágios iniciais (I e II) pode ser detectada pela mensuração das respostas específicas das células do sistema imune mediado por ensaio de liberação de IFN- $\gamma$  (WOOD et al., 1989). Porém, existem limitações para esse teste e uma delas é a logística para transportar a amostra do local de coleta para o laboratório por ter que acontecer dentro de oito a doze horas, comprometendo as células T produtoras de IFN- $\gamma$ . Outra limitação é o alto custo para manutenção de um laboratório com essa tecnologia (MAROUDAM et al., 2015).

A utilização de meios de cultura para o isolamento de MAP é um método altamente específico, mas é dispendioso e, geralmente, requer de 8 a 16 semanas de incubação para o crescimento de colônias visíveis em meios sólidos. É difícil determinar a sensibilidade da cultura assim como o isolamento de MAP nos estágios iniciais da doença, mas este é considerado o método padrão para diagnóstico desta enfermidade. Diferentes meios seletivos e não seletivos, contendo micobactina podem ser utilizados para o isolamento de MAP como o Lowenstein-Jensen, o meio Herrold's egg yolk, Middlebrook 7H11 ou meio de Dubos (SAXEGAARD, 1985; MANNING; COLLINS, 2001; DE JUAN et al., 2005; SLANA et al., 2008).

Uma característica importante de qualquer protocolo de cultura é a sua capacidade para prevenir o crescimento de contaminantes que podem estar presentes na amostra. No meio sólido, as colônias de MAP podem não ficar visíveis entre as colônias de outros microrganismos, mas, por vezes, ainda pode ser detectado na PCR (SECOTT et al., 1999; WHITTINGTON; WINDSOR, 2009). Entretanto, apesar das medidas adequadas de descontaminação, as culturas são, muitas vezes, perdidas em decorrência da contaminação (VARY et al., 1990).

A sensibilidade da PCR para amostras fecais é equivalente à da cultura, sendo que a técnica molecular apresenta uma maior especificidade, devido aos *primers* utilizados para evitar a detecção de bactérias ambientais (KAWAJI et al., 2007). Para a detecção de MAP, o gene alvo mais utilizado é a região IS900 que foi descrito pela primeira vez por Green et al. (1989), mas também foi descoberto, independentemente por Collins et al. (1989) e foi utilizado pela primeira vez como alvo numa PCR de diagnóstico por Vary et al. (1990). Alguns dos estudos mais citados, onde a PCR convencional foi aplicada na pesquisa de MAP, incluem investigações sobre a presença da bactéria em tecidos de pacientes com a doença de Crohn (MOSS et al., 1992; SANDERSON et al., 1992) e pesquisa em leite (MILLAR et al., 1996).

A PCR em Tempo Real oferece uma abordagem eficiente para a detecção de agentes patogênicos microbianos e, quando comparado com a PCR convencional o método possui determinadas vantagens, como: o potencial para quantificação do agente, risco mínimo de contaminação cruzada, uma maior sensibilidade e a especificidade é reforçada pela utilização de sondas (MACKAY, 2004).

A técnica de Imuno-histoquímica também tem sido utilizada para a detecção de MAP em animais acometidos, obtendo-se resultados mais sensíveis quando comparado com o isolamento em meios de cultura (THORESEN; FALK; EVENSEN, 1994).

Testes sorológicos são utilizados no diagnóstico da infecção ou confirmação da doença como: Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), ELISA e Fixação do Complemento (FC). O IDGA pode ser útil para a confirmação de casos clínicos, entretanto as taxas de sensibilidade e especificidade foram insatisfatórias para o diagnóstico da doença subclínica (estágios I e II da doença) (FERREIRA; FONSECA; LILENBAUM, 2002). O teste de Fixação do Complemento demonstrou ser menos eficiente na detecção de infecção subclínica quando comparado ao ELISA, pois este

último foi capaz de detectar anticorpos em estágio mais inicial da infecção quando comparado a FC (YOKOMIZO et al., 1991).

Vale ressaltar que a progressão da infecção aos diferentes estágios da enfermidade varia e vai depender da resposta imune individual dos animais. Portanto, nenhum teste de diagnóstico único pode ser aplicado para detectar a infecção em todos os estágios (MAROUDAM et al., 2015).

Em relação à caracterização de cepas de MAP, a técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação (RFLP) na sequência de inserção IS900 tem sido o sistema de tipificação mais utilizado (WHITTINGTON et al., 2000; MOTIWALA et al., 2006b). Nesta técnica, o DNA genômico é digerido com enzimas de restrição que cortam a região IS900 estudada em fragmentos menores; os fragmentos de DNA produzidos são então separados por eletroforese em gel de agarose e o resultado é posteriormente comparado com outras sequências padrões de MAP para auxiliar na definição de características genotípicas do microrganismo (BEHR; COLLINS, 2010). Porém, apesar do método de PCR-RFLP IS900 ser o mais utilizado na diferenciação entre linhagens de MAP de bovinos e ovinos, é considerado um método complexo, caro e que requer uma grande quantidade de material genético (COLLINS; GABRIC; DE LISLE, 1990b). Já a PCR-REA da região IS1311 de MAP permite uma rápida diferenciação entre os tipos *Cattle*, *Sheep* e subtipo *Bison* devido às mutações pontuais estáveis nessa sequência de inserção (MARSH; WHITTINGTON; COUSINS, 1999; WHITTINGTON et al., 2001; WHITTINGTON; MARSH; WHITLOCK, 2001).

## **2.5. Saúde Pública**

Um dilema para o controle da paratuberculose é se o MAP é estritamente um patógeno de animais ou se também é um agente que pode causar infecção no homem, associado à etiologia da doença de Crohn. A hipótese de que o MAP pode causar doença inflamatória intestinal humana remonta há um século (DALZIEL, 1913) e o interesse na associação de MAP com a doença de Crohn foi estimulado por uma revisão do assunto realizada por Chiodini (1989).

A Doença de Crohn é uma inflamação crônica do intestino que acomete principalmente o íleo. A resposta inflamatória granulomatosa transmural no íleo é

indicativa de doença de Crohn e há uma considerável semelhança entre a histopatologia do intestino de bovinos com paratuberculose (COLLINS, 1997).

São várias as evidências de que o MAP pode estar envolvido, de alguma forma, com o desenvolvimento da doença de Crohn. Dell'isola et al. (1994) detectaram o DNA desta bactéria, por meio da PCR, em crianças com a doença de Crohn. Naser et al. (2000) isolaram a bactéria em leite materno de pacientes com a doença de Crohn. Além disso, Naser et al. (2004), conseguiram o isolamento e a detecção do DNA de MAP no sangue de pessoas com a doença de Crohn. De 28 pacientes, obteve-se a cultura positiva em 14.

A biópsia também tem sido utilizada para investigar a presença de MAP em intestino como relatam Bull et al. (2003), que, utilizando a PCR em amostras de biópsia detectaram o DNA em 92% (34/37) dos pacientes com a Doença de Cronh contra 26% (9/34) de pacientes sem essa enfermidade. Lesões na mucosa oral já foram relatadas em mais de 40% dos pacientes com doença de Crohn (PITTOCK et al., 2001; HARTY et al., 2005). Um estudo que utilizou biópsias da mucosa oral de pacientes com a doença de Crohn conseguiram detectar o DNA da região IS900 do MAP em oito pacientes de um total de 23.

Além da doença de Crohn, o MAP também foi associado a outras enfermidades como a sarcoidose e síndrome de Blau (DOW; ELLINGSON, 2010), diabetes tipo 1 (SECHI et al., 2008; COSSU et al., 2011), tireoidite de Hashimoto (D'AMORE et al., 2010; PINNA et al., 2014) e esclerose múltipla (COSSU et al., 2011; FRAU et al., 2015). Na diabetes autoimune, tireoidite e esclerose múltipla, suspeita-se que esta bactéria induza a patologia devido ao mimetismo molecular entre os elementos proteicos que constituem a bactéria e os elementos que constituem o órgão alvo do hospedeiro (MASALA et al., 2011, 2014; PINNA et al., 2014). O mimetismo molecular por um microrganismo foi colocado como hipótese por iniciar e exacerbar uma resposta autoimune através de sequências ou semelhanças estruturais com antígenos do próprio organismo (CUSICK; LIBBEY; FUJINAMI, 2012). A febre reumática é um dos melhores exemplos de mimetismo molecular entre estreptococos e antígenos hospedeiros que conduzem a glomerulonefrite e doença cardíaca reumática (ZABRISKIE; HSU; SEEGAL, 1970; GUILHERME; KALIL; CUNNINGHAM, 2006).

Se existe algum tipo de associação, não necessariamente causal, entre o MAP e, pelo menos alguns casos da doença de Crohn, então, existem evidências suficientes de domínio público, indicando que o leite é uma potencial fonte de transmissão de microrganismos viáveis de bovinos para humanos, mesmo após a pasteurização (ELLINGSON et al., 2005; GRANT, 2005). Na literatura são várias as pesquisas que relatam a detecção desta bactéria em diversos tipos de alimentos (Tabela 3).

**Tabela 3:** Relatos da detecção de MAP em amostras de leite, queijo, leite em pó e carnes no mundo.

<b>Autores</b>	<b>Ano</b>	<b>Localidade</b>	<b>Tipo de Alimento</b>	<b>Método de Detecção (Positivos)</b>
HRUSKA et al.	2005	União Europeia	Fórmula Infantil	PCR IS900 (49%) qPCR F57 (35.3%)
GRANT et al.	2002	União Europeia	Leite Cru Leite Pasteurizado	PCR (7,8%) / Isolamento (1.6%) PCR (11,8%) / Isolamento (1.8%)
STEPHAN et al.	2007	Suíça	Queijo	Isolamento (Negativo) qPCR F57 (4.2%)
ALONSO-HEARN et al.	2009	Espanha	Carne	PCR e Isolamento (13%)
CARVALHO et al.	2009	Brasil	Leite Cru	PCR IS900 (3.6%)
WILLIAMS; WITHERS	2010	Escócia	Queijo	PCR IS900 (25%)
FARIA et al.	2014	Brasil	Queijo	PCR IS900 (10%) Isolamento (3.3%)
ACHARYA et al.	2017	Austrália	Fórmula Infantil	qPCR IS900 (4,9%) Isolamento (Negativo)
ALBUQUERQUE et al.	2017	Brasil	Leite Cru	PCR IS900 (16.5%) qPCR IS900 (28.1%)

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Realizar um estudo sobre a epidemiologia molecular da paratuberculose em rebanhos bovinos, bubalinos e amostras de queijo tipo coalho destas espécies.

### 2.2. Objetivos específicos

- Detectar a região IS900 do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em amostras biológicas provenientes de bovinos e bubalinos de algumas regiões do Brasil na técnica da PCR.
- Tipificar *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de amostras biológicas provenientes de bovinos e bubalinos de algumas regiões do Brasil pela técnica da PCR-REA da região IS1311.
- Detectar a região IS900 do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em amostras de queijo tipo coalho provenientes do Estado de Pernambuco pelo método da qPCR.
- Isolar e tipificar *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de amostras de queijo coalho de búfala com a técnica da PCR-REA da região IS1311.



### 3. Referências

- ACHARYA, K. R.; DHAND, N. K.; WHITTINGTON, R. J.; PLAIN, K. M. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in powdered infant formula using IS900 quantitative PCR and liquid culture media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 1–9, 2017.
- ACYPRESTE, C. S.; JULIANO, R. S.; RIVEIRA, F. E. B.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTI, M. C. S.; DIAS-FILHO, F. C. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 55–59, 2005.
- ALBUQUERQUE, P. P. F. de. **Epidemiologia molecular de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis em amostras biológicas de bovinos, bubalinos e queijo tipo coalho**. 2018. Tese de Doutorado em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2018.
- ALBUQUERQUE, P. P. F. de; SANTOS, A. de S.; SOUZA NETO, O. L. de; KIM, P. de C. P.; CAVALCANTI, E. F. T. S. F.; OLIVEIRA, J. M. B. de; MOTA, R. A.; JÚNIOR, J. W. P. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk from the state of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 113–117, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.010>>.
- ALEXANDER, D. C.; TURENNE, C. Y.; BEHR, M. A. Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 3, p. 1018–1025, 2009.
- ALONSO-HEARN, M.; MOLINA, E.; 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**, v. 6, n. 4, p. 513–518, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19415976>%5Cn[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19415976](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19415976)>.
- BASSEY, E. O. E.; COLLINS, M. T. Study of T-lymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Infected cattle. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 11, p. 4869–4872, 1997.

BATISTA, G.; PACHECO, T.; VIEDO, D. Principais causas de descarte em búfalos abatidos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Science and Animal Health**, v. 4, n. 1, p. 56–66, 2016.

BEHR, M. A.; COLLINS, D. M. **Paratuberculosis : organism, disease, control**. [s.l.] CAB International, 2010.

BELO REIS, A. S.; BRITO, M. F.; BOMJARDIM, H. A.; FAIAL, K. C. F.; SALVARANI, F. M.; UBIALI, D. G.; OLIVEIRA, C. M. C.; BARBOSA, J. D. Teores de cobre, zinco e ferro no fígado de búfalos (*Bubalus bubalis*) com paratuberculose. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, n. 1, p. 24–28, 2016.

BENAZZI, S.; EL HAMIDI, M.; SCHLIESSER, T. Paratuberculosis in sheep flocks in Morocco: a serological, microscopical and cultural survey. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B**, v. 43, n. 4, p. 213–9, 1996.

BENEDICTUS, G.; DIJKHUIZEN, A. A.; STELWAGEN, J. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. **Veterinary Record**, v. 121, n. 7, p. 142–146, 1987. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3660545](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3660545)>.

BRAUTINGAM, F. E.; GLASS, R.; MENDY, W. Levantamento sorológico utilizando a técnica de ELISA para paratuberculose em cinco rebanhos de corte do Mato Grosso do Sul e quatro de leite do Estado de São Paulo. **15º Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**, p. 271, 1996.

BRITO, M. F.; DOS SANTOS BELO-REIS, A.; BARBOSA, J. D.; UBIALI, D. G.; DE CASTRO PIRES, A. P.; DE MEDEIROS, E. S.; DE MELO, R. P. B.; DE ALBUQUERQUE, P. P. F.; YAMASAKI, E.; MOTA, R. A. Paratuberculosis in buffaloes in Northeast Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 7, p. 1497–1501, 2016.

BUERGELT, C. D.; HALL, C.; MCENTEE, K.; DUNCAN, J. R. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. **Veterinary pathology**, v. 15, n. 2, p. 196–207, 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880110>><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub>

med/664186>.

BULL, T. J.; MCMINN, E. J.; SIDI-BOUMEDINE, K.; SKULL, A.; DURKIN, D.; NEILD, P.; RHODES, G.; PICKUP, R.; HERMON-TAYLOR, J. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 2915–2923, 2003.

CARVALHO, I. a; SILVA, a; CAMPOS, V. E. B.; MOREIRA, M. a S. Short communication: detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by polymerase chain reaction in bovine milk in Brazil. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 11, p. 5408–5410, 2009.

CARVALHO, I. azevedo. **Isolamento e detecção molecular de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) em rebanhos bovinos leiteiros na região de Viçosa- MG**. 2008. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2008.

CHIODINI, R. J. Crohn's disease and the mycobacterioses: A review and comparison of two disease entities. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n. 1, p. 90–117, 1989.

CLARKE, C. J. The pathology and pathogenesis of *paratuberculosis* in ruminants and other species. **Journal of Comparative Pathology**, v. 116, n. 1906, p. 217–261, 1997.

COLLINS, D. M.; DE LISLE, G. W. Restriction endonuclease analysis of strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 2226–2229, 1986.

COLLINS, D. M.; GABRIC, D. M.; DE LISLE, G. W. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. **FEMS microbiology letters**, v. 51, n. 1, p. 175–8, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2777063>>.

COLLINS, D. M.; GABRIC, D. M.; DE LISLE, G. W. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 7, p. 1591–1596, 1990a.

COLLINS, D. M.; GABRIC, D. M.; DE LISLE, G. W. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1591–1596, 1990b.

COLLINS, M. T. Mycobacterium paratuberculosis: A Potential Food-Borne Pathogen? **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 12, p. 3445–3448, 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030297763215>>.

COLLINS, M. T. Epidemiology of Johne's disease and the biology of Mycobacterium paratuberculosis. **Irish Veterinary Journal**, v. 56, n. 11, p. 565–574, 2003.

COSSU, A.; ROSU, V.; PACCAGNINI, D.; COSSU, D.; PACIFICO, A.; SECHI, L. A. MAP3738c and MptD are specific tags of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in type I diabetes mellitus. **Clinical Immunology**, v. 141, n. 1, p. 49–57, 2011.

COSTA, J. C. M.; PIERI, F. A.; SOUZA, C. F.; ESPESCHIT, I. F.; FELIPPE, A. G.; SANTOS, G. M.; TOBIA, F. L.; SILVA JUNIOR, A.; MOREIRA, M. A. S. Levantamento sorológico de Mycobacterium avium subesp. Paratuberculosis em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1491–1494, 2010.

COUSSENS, P. M. Mycobacterium paratuberculosis and the bovine immune system. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 2, n. 2, p. 141–161, 2001.

COUSSENS, P. M. Model for immune responses to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in cattle. **Infection and immunity**, v. 72, n. 6, p. 3089–3096, 2004.

CUNHA, P. H. J.; MARTINS, A. F.; FIORAVANTI, M. C. S.; BRITO, L. A. B.; ARAÚJO, E. G.; SILVA, L. A. F.; RABELO, R. E.; JARDIM, E. A. G. V. Avaliação microbiológica e anatomopatológica da paratuberculose bovina: relato de caso. **Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Botucatu**, p. 118, 2003.

CUSICK, M. F.; LIBBEY, J. E.; FUJINAMI, R. S. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 42, n. 1, p. 102–111, 2012.

D'AMORE, M.; LISI, S.; SISTO, M.; CUCCI, L.; DOW, C. T. Molecular identification of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in an Italian patient with Hashimoto's thyroiditis and Melkersson-Rosenthal syndrome. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 137–139, 2010.

DA SILVA, J. B.; LOPES, C. T. de A.; DE SOUZA, M. G. S.; GIBSON, A. F. B.;

VINHOTE, W. M. de S.; DE FONSECA, A. H.; DE ARAÚJO, F. R.; BARBOSA-NETO, J. D. Detecção sorológica e molecular de *Anaplasma marginale* em búfalos na ilha de Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 11–14, 2014.

DALTO, A. C.; BANDARRA, P. M.; PAVARINI, S. P.; BOABAID, F. M.; DE BITENCOURT, A. P. G.; GOMES, M. P.; CHIES, J.; DRIEMEIER, D.; DA CRUZ, C. E. F. Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 8, p. 1899–1904, 2012.

DALZIEL, T. K. Chronic interstitial enteritis. **British Medical Journal**, 1913.

DE JUAN, L.; ÁLVAREZ, J.; ROMERO, B.; BEZOS, J.; CASTELLANOS, E.; ARANAZ, A.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 5927–5932, 2006.

DE JUAN, L.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; SHARP, J. M.; STEVENSON, K. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 3–4, p. 249–257, 2005.

DELL'ISOLA, B.; POYART, C.; GOULET, O.; MOUGENOT, J. F.; SADOUN-JOURNO, E.; BROUSSE, N.; SCHMITZ, J.; RICOUR, C.; BERCHE, P. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by polymerase chain reaction in children with Crohn's disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 169, n. 2, p. 449–51, 1994.

DIAS-FILHO, M. B. **Uso de Pastagens para a Produção de Bovinos de Corte no Brasil: Passado, Presente e Futuro**. Belém - PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2016.

DIMARELI-MALLI, Z.; MAZARAKI, K.; STEVENSON, K.; TSAKOS, P.; ZDRAGAS, A.; GIANTZI, V.; PETRIDOU, E.; HERON, I.; VAFEAS, G. Culture phenotypes and molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from small ruminants. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 1, p. 49–53, 2013.

DOW, C. T.; ELLINGSON, J. L. E. Detection of *Mycobacterium avium* ss. *Paratuberculosis* in Blau Syndrome Tissues. **Autoimmune Diseases**, v. 2010, p. 1–5, 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ad/2010/127692/>>.

DRIEMEIER, D.; FARIAS CRUZ, C. E.; PEREIRA GOMES, M. J.; CORBELLINI, L. G.; LORETTI, A. P.; COLODEL, E. M. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3–4, p. 109–115, 1999.

DUPONT, O. No Title. **Jornal do Comércio do Rio de Janeiro**, 1915.

ELLINGSON, J. L. E.; ANDERSON, J. L.; KOZICZKOWSKI, J. J.; RADCLIFF, R. P.; SLOAN, S. J.; ALLEN, S. E.; SULLIVAN, N. M. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. **Journal of food protection**, v. 68, n. 5, p. 966–972, 2005.

EPPLESTON, J.; BEGG, D. J.; DHAND, N. K.; WATT, B.; WHITTINGTON, R. J. Environmental survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in different climatic zones of eastern Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2337–2342, 2014.

FARIA, A. C. S.; SCHWARZ, D. G. G.; CARVALHO, I. A.; ROCHA, B. B.; DE CARVALHO CASTRO, K. N.; SILVA, M. R.; MOREIRA, M. A. S. Short communication: Viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail artisanal Coalho cheese from Northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4111–4114, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214003257>>.

FERREIRA, R.; FONSECA, L. S.; LILENBAUM, W. Detection of anti-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antibodies in Brazilian herds. **Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis**, p. 463–464, 2001.

FERREIRA, R.; FONSECA, L. S.; LILENBAUM, W. Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 173–175, 2002.

FISS, L.; SANTOS, B. L.; ALBUQUERQUE, P. P. F. de; MOTA, R. A.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; ADRIEN, M. de L.; SOARES, M. P.; SCHILD, A. L. Paratuberculose em bovinos de corte na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 437–442, 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-)

736X2015000500437&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

FONSECA, L. F.; OLIVAL, A. A.; PEREIRA, C. C.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L. J.; SANTOS, M. V. Identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 28, p. 51–56, 2000.

FRAU, J.; COSSU, D.; COGHE, G.; LOREFICE, L.; FENU, G.; PORCU, G.; SARDU, C.; MURRU, M. R.; TRANQUILLI, S.; MARROSU, M. G.; SECHI, L. A.; COCCO, E. Role of interferon-beta in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* antibody response in Sardinian MS patients. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 349, n. 1–2, p. 249–250, 2015.

FRITSCH, I.; LUYVEN, G.; KÖHLER, H.; LUTZ, W.; MÖBIUS, P. Suspicion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* transmission between cattle and wild-living red deer (*Cervus elaphus*) by multitarget genotyping. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1132–1139, 2012.

GHADIALI, A. H.; STROTHER, M.; NASER, S. A.; MANNING, E. J. B. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains Isolated from Crohn's Disease Patients and Animal Species Exhibit Similar Polymorphic Locus Patterns. **Society**, v. 42, n. 11, p. 5345–5348, 2004.

GLANEMANN, B.; SCHÖNENBRÜCHER, H.; BRIDGER, N.; ABDULMAWJOOD, A.; NEIGER, R.; BÜLTE, M. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis*-specific DNA by PCR in intestinal biopsies of dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 5, p. 1090–1094, 2008.

GOMES, M. J. P.; DRIEMEIER, D.; RIBEIRO, V. R.; WUNDER JR, E. A.; ASANOME, W.; LANZON, L. F.; WALD, V. B. Doença de Johne: Isolamento do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) em um rebanho leiteiro infectado na região Sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 2, p. 113–118, 2002.

GRANT, I. R. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: The current position. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1282–1293, 2005.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. **Applied and Environmental**

**Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2428–2435, 2002.

GREEN, E. P.; TIZARD, M. L. V.; MOSS, M. T.; THOMPSON, J.; WINTERBOURNE, D. J.; MCFADDEN, J. J.; HERMON-TAYLOR, J. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 22, p. 9063–9073, 1989.

GUILHERME, L.; KALIL, J.; CUNNINGHAM, M. Molecular mimicry in the autoimmune pathogenesis of rheumatic heart disease. **Autoimmunity**, v. 39, n. 1, p. 31–39, 2006.

GUMBER, S.; WHITTINGTON, R. J. Comparison of BACTEC 460 and MGIT 960 systems for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* S strain and observations on the effect of inclusion of ampicillin in culture media to reduce contamination. **Veterinary Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 42–52, 2007.

HARRIS, N. B.; BARLETTA, R. G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 489–512, 2001.

HARTY, S.; FLEMING, P.; ROWLAND, M.; CRUSHELL, E.; MCDERMOTT, M.; DRUMM, B.; BOURKE, B. A prospective study of the oral manifestations of Crohn's disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association**, v. 3, n. 9, p. 886–891, 2005.

HASONOVA, L.; TRCKA, I.; BABAK, V.; ROZSYPALOVA, Z.; PRIBYLOVA, R.; PAVLIK, I. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissues of naturally infected cattle as affected by age. **Veterinarni Medicina**, v. 54, n. 6, p. 257–269, 2009.

HRUSKA, K.; BARTOS, M.; KRALIK, P.; PAVLIK, I. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: Paratuberculosis in cattle - The public health problem to be solved. **Veterinarni Medicina**, v. 50, n. 8, p. 327–335, 2005.

HRUSKA, K.; SLANA, I.; KRALIK, P.; PAVLIK, I. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: F57 competitive real time PCR. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 5, p. 226–230, 2011.

HUTCHINGS, M. R.; STEVENSON, K.; GREIG, A.; DAVIDSON, R.; MARION, G.;



JUDGE, J. Infection of non-ruminant wildlife by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: BEHR, M. A.; COLLINS, D. M. (Ed.). **Paratuberculosis - Organism, Disease, Control**. Cambridge: CAB International, 2010. p. 188–200.

JANAGAMA, H. K.; JEONG, K. il; KAPUR, V.; COUSSENS, P.; SREEVATSAN, S. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 1471–2180 (Electronic), p. 10, 2006. Disponível em: <file:///C:/My Documents/Papers/Janagama et al 2006 BMC Microbiology 6 (10).pdf%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1382238&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

JOHNSON-IFEARULUNDU, Y.; KANEENE, J. B. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 5, p. 589–596, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\_uids=10328429>.

KAWAJI, S.; TAYLOR, D. L.; MORI, Y.; WHITTINGTON, R. J. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. **Veterinary Microbiology**, v. 125, n. 1–2, p. 36–48, 2007.

KENNEDY, D. J.; BENEDICTUS, G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. **Revue Scientifique Et Technique**, v. 20, n. 1, p. 151–179, 2001.

KUMAR, S.; SINGH, S. V.; SINGH, A. V.; SINGH, P. K.; SOHAL, J. S. Inter-species transmission of “Bison type” genotype of MAP between *boselaphus tragocamelus* (blue bulls) and small ruminant population in India. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 78, n. 11, p. 1186–1191, 2008.

LAMONT, E. A.; BANNANTINE, J. P.; ARMIÉN, A.; ARIYAKUMAR, D. S.; SREEVATSAN, S. Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

LARSEN, A. B.; MERKAL, R. S.; VARDAMAN, T. H. Survival time of

*Mycobacterium paratuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, 1956.

LOVELL, R.; LEVI, M.; FRANCIS, J. Studies on the survival of Johnne's bacilli. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 54, p. 120–129, 1944.

LUGTON, I. W. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. **Immunology and Cell Biology**, v. 77, n. 4, p. 364–372, 1999.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 3, p. 190–212, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>>.

MANNING, E. J.; COLLINS, M. T. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 20, n. 1, p. 133–50, 2001. Disponível em: <<http://europemc.org/abstract/med/11288509>>.

MAROUDAM, V.; MOHANA SUBRAMANIAN, B.; PRAVEEN KUMAR, P.; DHINAKAR RAJ, G. Paratuberculosis: Diagnostic Methods and their Constraints. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 6, n. 5, 2015. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/paratuberculosis-diagnostic-methods-and-their-constraints-2157-7579-1000259.php?aid=60532>>.

MARSH, I.; WHITTINGTON, R.; COUSINS, D. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, n. 2, p. 115–126, 1999. Disponível em: <<papers3://publication/uuid/9C9D0064-000B-43AB-BCE7-86E82AFFB1B2>>.

MASALA, S.; COSSU, D.; PALERMO, M.; SECHI, L. A. Recognition of zinc transporter 8 and MAP3865c homologous epitopes by hashimoto's thyroiditis subjects from Sardinia: A common target with type 1 diabetes? **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

MASALA, S.; PACCAGNINI, D.; COSSU, D.; BREZAR, V.; PACIFICO, A.; AHMED, N.; MALLONE, R.; SECHI, L. A. Antibodies recognizing mycobacterium avium paratuberculosis epitopes cross-react with the beta-cell antigen znt8 in sardinian type 1 diabetic patients. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

MCCLURE, H. M.; CHIODINI, R. J.; ANDERSON, D. C.; SWENSON, R. B.;

THAYER, W. R.; COUTU, J. A. Mycobacterium Paratuberculosis Infection in a Colony of Stumptail Macaques (*Macaca Arctoides*). **Journal of Infectious Diseases**, v. 155, n. 5, p. 1011–1019, 1987.

MCKENNA, S. L. B.; KEEFE, G. P.; TIWARI, A.; VANLEEUWEN, J.; BARKEMA, H. W. Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. **The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne**, v. 47, n. 11, p. 1089–99, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17147140>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1624920>>.

MEDEIROS, J. M. de A.; JUNIOR, F. G.; MATOS, R. A. T.; COSTA, V. M. de M.; RIET-CORREA, F. Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 697–700, 2012.

MILLAR, D.; FORD, J.; SANDERSON, J.; WITHEY, S.; TIZARD, M.; DORAN, T.; HERMON-TAYLOR, J. IS900 PCR to detect Mycobacterium paratuberculosis in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3446–3452, 1996.

MOLONEY, B. J.; WHITTINGTON, R. J. Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: An estimate of prevalence in exposed susceptible cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 86, n. 4, p. 117–123, 2008.

MOMOTANI, E.; WHIPPLE, D. L.; 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 in calves. **Veterinary pathology**, v. 25, n. 2, p. 131–137, 1988.

MORAVKOVA, M.; BARTOS, M.; DVORSKA-BARTOSOVA, L.; BERAN, V.; PARMOVA, I.; OCEPEK, M.; PATE, M.; PAVLIK, I. Genetic variability of Mycobacterium avium subsp. avium of pig isolates. **Veterinarni Medicina**, v. 52, n. 10, p. 430–436, 2007.

MOSS, M.; SANDERSON, J.; TIZARD, M.; HERMON-TAYLOR, J.; EL-ZAATARI, F.; MARKESICH, D.; GRAHAM, D. Polymerase chain reaction detection of Mycobacterium paratuberculosis and Mycobacterium avium subsp silvaticum in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. **Gut**, v. 33, n. 9, p. 1209–1213,

1992.

MOTA, P. M. P. C.; PIRES, P. S.; ASSIS, R. a. De; SALVARANI, F. M.; LEITE, R. D. M. H.; DIAS, L. D.; LEITE, R. C.; LOBATO, F. C. F.; GUEDES, R. M. C.; LAGE, A. P. Paratuberculosis in a dairy Gyr herd in the State of Paraíba, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 703–706, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X20090009000004&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X20090009000004&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

MOTA, R. A.; PEIXOTO, P. V.; YAMASAKI, E. M.; DE MEDEIROS, E. S.; DA COSTA, M. M.; PEIXOTO, R. M.; BRITO, M. F. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 237–242, 2010.

MOTA, R.; PINHEIRO JUNIOR, J.; GOMES, M.; PEIXOTO, R.; MAIA, F.; BRITO, M.; CHIES, J.; SNEL, G.; BERCHT, B.; JUFFO, G. Paratuberculose Em Um Rebanho Bovino Leiteiro No Estado De Pernambuco, Pe. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 2, p. 73–79, 2007. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74\\_2/mota.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74_2/mota.pdf)>.

MOTIWALA, A. S.; JANAGAMA, H. K.; PAUSTIAN, M. L.; ZHU, X.; BANNANTINE, J. P.; KAPUR, V.; SREEVATSAN, S. Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis with diverse genotypes. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6046–6056, 2006a.

MOTIWALA, A. S.; LI, L.; KAPUR, V.; SREEVATSAN, S. Current understanding of the genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 5, p. 1406–1418, 2006b.

MOTIWALA, A. S. S.; AMONSIN, A.; STROTHER, M.; MANNING, E. J. B. J.; KAPUR, V.; SREEVATSAN, S. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 0095–1137, p. 1703–1712, 2004. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/42/4/1703>>.

MUNSTER, P.; VOLKEL, I.; WEMHEUER, W.; SCHWARZ, D.; DORING, S.; CZERNY, C. P. A Longitudinal Study to Characterize the Distribution Patterns of

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Semen, Blood and Faeces of a Naturally Infected Bull by IS 900 Semi-Nested and Quantitative Real-Time PCR. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, n. 2, p. 175–187, 2013.

NAKAJIMA, M.; MAIA, F. C. L.; MOTA, P. M. P. C. Diagnóstico da paratuberculose em Minas Gerais. **4º Simpósio Brasileiro em Micobactérias**, p. 67, 1991.

NASER, S. A.; GHOBRIAL, G.; ROMERO, C.; VALENTINE, J. F. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. **The Lancet**, v. 364, n. 9439, p. 1039–1044, 2004.

NASER, S. A.; SCHWARTZ, D.; SHAFRAN, I. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 4, p. 1094–1095, 2000.

NIELSEN, S. S.; BJERRE, H.; TOFT, N. Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 12, p. 4610–4615, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1272>>.

O'BRIEN, R.; MACKINTOSH, C. G.; BAKKER, D.; KOPECNA, M.; PAVLIK, I.; GRIFFIN, J. F. T. Immunological and molecular characterization of susceptibility in relationship to bacterial strain differences in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the red deer (*Cervus elaphus*). **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3530–3537, 2006.

OTT, S. L.; WELLS, S. J.; WAGNER, B. A. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, n. 3–4, p. 179–192, 1999.

PINNA, A.; MASALA, S.; BLASETTI, F.; MAIORE, I.; COSSU, D.; PACCAGNINI, D.; MAMELI, G.; SECHI, L. A. Detection of serum antibodies cross-reacting with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and beta-cell antigen zinc transporter 8 homologous peptides in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

PITTOCK, S.; DRUMM, B.; FLEMING, P.; MCDERMOTT, M.; IMRIE, C.; FLINT, S.; BOURKE, B. The oral cavity in Crohn's disease. **The Journal of pediatrics**, v. 138, n. 5, p. 767–771, 2001.

PORTUGAL, M. A. S. C.; PIMENTEL, J. N.; SALIBA, A. M.; BALDASSI, L.; SANDOVAL, E. F. D. Ocorrência de paratuberculose no Estado de Santa Catarina. **Biológico**, v. 4, p. 19–24, 1979.

POUPART, P.; COENE, M.; VAN HEUVERSWEYN, H.; COCITO, C. Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 1601–1605, 1993.

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., HINCHCLIFF, K. W., & C. Diseases associated with bacteria. In: RODENHUIS, J.; BALL, E. (Ed.). **Veterinary Medicine: a Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats**. 10. ed. [s.l.] Saunders Elsevier, 2007. p. 1017–1044.

RAMOS, E. T.; POESTER, F. P.; CORREA, B. L.; OLIVEIRA, S. J.; RODRIGUES, N. C.; CABARRO, C. E. Paratuberculose em bovinos no Estado de Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 6, n. 34, p. 28–32, 1986.

REDDACLIFF, L. A.; VADALI, A.; WHITTINGTON, R. J. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. **Veterinary Microbiology**, v. 95, n. 4, p. 271–282, 2003.

REIS, A. S. B.; BRITO, M. F.; BEZERRA JÚNIOR, P. S.; FONSECA JÚNIOR, A. A.; UBIALI, D. G.; MOTA, R. A.; LEITE, R. C.; BARBOSA, J. D. Diagnóstico de paratuberculose por biópsia retal em búfalos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 10, p. 823–828, 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2015001000823&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2015001000823&lng=pt&tlng=pt)>.

ROBERTSON, R. E.; CERF, O.; CONDRON, R. J.; DONAGHY, J. A.; HEGGUM, C.; JORDAN, K. Review of the controversy over whether or not *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* poses a food safety risk with pasteurised dairy products. **International Dairy Journal**, v. 73, p. 10–18, 2017.

RODRIGUES, C. F. C.; LAPICHINI, J. E. C. B. .; LISERRE, A. M. .; SOUZA, K. B. .; FACHINI, C. .; REICHERT, R. H. Bubalinocultura familiar da região sudoeste paulista. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, p. 10, 2008.

SÁ, L. D. M.; OLIVEIRA, J. M. B. De; SANTOS, G. R.; BRANDESPIM, D. F.;

JÚNIOR, J. L. S.; MOTA, R. A.; M, A. S. L.; OLIVEIRA, J. M. B.; SANTOS, G. R.; BRANDESPIM, D. F.; MOTA, R. A. Avaliação sorológica e de fatores de risco para a infecção por *Mycobacterium avium* subsp . *paratuberculosis* em rebanhos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 310–313, 2013.

SANDERSON, J. D.; MOSS, M. T.; TIZARD, M. L.; HERMON-TAYLOR, J. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. **Gut**, v. 33, p. 890–896, 1992.

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

SAXEGAARD, F. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes of goats by use of selective dubos medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 312–313, 1985.

SECHI, L. a; PACCAGNINI, D.; SALZA, S.; PACIFICO, A.; AHMED, N.; ZANETTI, S. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* bacteremia in type 1 diabetes mellitus: an infectious trigger? **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 1, p. 148–149, 2008.

SECOTT, T. E.; OHME, a M.; BARTON, K. S.; WU, C. C.; ROMMEL, F. a. *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bovine feces is improved by coupling agar culture enrichment to an IS900-specific polymerase chain reaction assay. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 11, n. 5, p. 441–447, 1999.

SEFFNER, W. Paratuberculose. In: **Doenças infecciosas em animais domésticos**. Roca ed. [s.l: s.n.]p. 286–289.

SEVILLA, I.; GARRIDO, J. M.; GEIJO, M.; JUSTE, R. A. Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. **BMC microbiology**, v. 7, p. 18, 2007.

SEVILLA, I. X.; SINGH, S. V; GARRIDO, J. M.; ADURIZ, G.; RODRÍGUEZ, S.; GEIJO, M. V; WHITTINGTON, R. J.; SAUNDERS, V.; WHITLOCK, R. H.; JUSTE, R. a. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains

from different hosts and regions. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 24, n. 3, p. 1061–1066, 2005.

SILVA, E. B. **Diagnóstico de paratuberculose em bovinos de corte do estado do Pará-Brasil**. 2005. Universidade Federal do Pará, Castanhal, 2005.

SINGH, S. V.; SOHAL, J. S.; SINGH, P. K.; SINGH, A. V. Genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolates recovered from animals, commercial milk, and human beings in North India. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, 2009.

SLANA, I.; PAOLICCHI, F.; JANSTOVA, B.; NAVRATILOVA, P.; PAVLIK, I. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n. 6, p. 283–306, 2008.

SMITH, B. P. **Medicina Interna de Grandes Animales**. [s.l: s.n.]

STABEL, J. R. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 77, n. 3–4, p. 465–473, 2000.

STEPHAN, R.; SCHUMACHER, S.; TASARA, T.; GRANT, I. R. Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 8, p. 3590–3595, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0015>>.

STEVENSON, K. Comparative differences between strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: BEHR, M. A.; COLLINS, D. M. (Ed.). **Paratuberculosis: organism, disease, control**. Cambridge: CAB International, 2010. p. 126–138.

STEVENSON, K.; ALVAREZ, J.; BAKKER, D.; BIET, F.; DE JUAN, L.; DENHAM, S.; DIMARELI, Z.; DOHMANN, K.; GERLACH, G. F.; HERON, I.; KOPECNA, M.; MAY, L.; PAVLIK, I.; SHARP, J. M.; THIBAUT, V. C.; WILLEMSSEN, P.; ZADOKS, R. N.; GREIG, A. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 212, 2009.

STREETER, R. N.; HOFFSIS, G. F.; BECH-NIELSEN, S.; SHULAW, W. P.; RINGS, D. M. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. **American journal of veterinary research**, v. 56, n. 10, p.



1322–1324, 1995.

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

SWEENEY, R. W.; WHITLOCK, R. H.; ROSENBERGER, A. E. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 166–171, 1992.

TAYLOR, A. W. Varieties of *Mycobacterium johnei* from sheep. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 63, p. 333–336, 1951.

THIBAUT, V.; BRYANT, J.; HARRIS, S.; BENTLEY, S.; SMITH, D.; MCLUCKIE, J.; PARKHILL, J.; STEVENSON, K. Genome sequencing to identify phylogenetic diversity and single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. In: Proceedings of the Eleventh International Colloquium on Paratuberculosis, Sydney. **Anais...** Sydney: International Association for Paratuberculosis, 2012.

THORESEN, O. F.; FALK, K.; EVENSEN, O. Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining, and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 2, p. 195–199, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8068751>>.

TRAVERÍA, G. E.; ZUMARRAGA, M.; ETCHECHOURY, I.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; ALVARADO PINEDO, M. F.; PAVLIK, I.; PRIBYLOVA, R.; ROMERO, J. R. First identification of *Mycobacterium avium paratuberculosis* sheep strain in Argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 897–899, 2013.

VARY, P. H.; ANDERSEN, P. R.; GREEN, E.; HERMON-TAYLOR, J.; MCFADDEN, J. J. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 933–937, 1990. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/28/5/933>>.

VERNA, A. E.; GARCIA-PARIENTE, C.; MUÑOZ, M.; MORENO, O.; GARCÍA-MARIN, J. F.; ROMANO, M. I.; PAOLICCHI, F.; PÉREZ, V. Variation in the

immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Zoonoses and Public Health**, v. 54, n. 6–7, p. 243–252, 2007.

WATERS, W. R.; MILLER, J. M.; PALMER, M. V; STABEL, J. R.; JONES, D. E.; KOISTINEN, K. A.; STEADHAM, E. M.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C.; BANNANTINE, J. P. Early Induction of Humoral and Cellular Immune Responses during Experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection of Calves. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 5130–5138, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/iai.71.9.5130-5138.2003><http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/71/9/5130>>.

WHAN, L.; GRANT, I.; BALL, H.; SCOTT, R.; ROWE, M. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. **Letters in applied microbiology**, v. 33, n. 3, p. 227–231, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11555209>>.

WHITTINGTON, R. J. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 614–622, 2009.

WHITTINGTON, R. J.; HOPE, A. F.; MARSHALL, D. J.; TARAGEL, C. A.; MARSH, I. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3240–3248, 2000.

WHITTINGTON, R. J.; MARSH, I. B.; WHITLOCK, R. H. Typing of IS 1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. **Molecular and cellular probes**, v. 15, n. 3, p. 139–45, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890850801903469>>.

WHITTINGTON, R. J.; TARAGEL, C. A.; OTTAWAY, S.; MARSH, I.; SEAMAN, J.; FRIDRIKSDOTTIR, V. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland.

**Veterinary Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 311–322, 2001.

WHITTINGTON, R. J.; WINDSOR, P. A. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 179, n. 1, p. 60–9, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307003061>>.

WHITTINGTON, R.; MARSH, I.; CHOY, E.; COUSINS, D. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. **Molecular and cellular probes**, v. 12, n. 6, p. 349–58, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890850898901943>>.

WILLIAMS, A. G.; WITHERS, S. E. Microbiological characterisation of artisanal farmhouse cheeses manufactured in Scotland. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 3, p. 356–369, 2010.

WOOD, P. R.; KOPSIDAS, K.; MILNER, A. R.; HILL, J.; GILL, I.; WEBB, R.; MACK, W. N.; COATES, K. The development of an in vitro cellular assay for Johne's disease in cattle. In: MILNER, A. R.; WOODS, P. R. (Ed.). **Johne's Disease: Current Trends in Research, Diagnosis and Management**. Melbourne, Australia: CSIRO Publications, 1989.

YADAV, D.; SINGH, S. V.; SINGH, A. V.; SEVILLA, I.; JUSTE, R. A.; SINGH, P. K.; SOHAL, J. S. Pathogenic "Bison-type" *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genotype characterized from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) in North India. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 373–387, 2008.

YAMASAKI, E. M.; BRITO, M. de F.; MCINTOSH, D.; GALVÃO, A.; PEIXOTO, T. C.; TOKARNIA, C. H. Diagnóstico imuno-histopatológico da paratuberculose subclínica em bovinos no estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1427–1432, 2013a.

YAMASAKI, E. M.; BRITO, M. F.; MOTA, R. A.; MCINTOSH, D.; TOKARNIA, C. H. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 127–140, 2013b.

YAMASAKI, E. M.; TOKARNIA, C. H.; GALVÃO, A.; GOMES, M. J. P.; CHIES, J.

A. B.; VEIT, T. D.; ARAGÃO, A. P.; BRITO, M. F. Aspectos clínico-patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 921–932, 2010.

YOKOMIZO, Y.; KISHIMA, M.; MORI, Y.; NISHIMORI, K. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 53, n. 4, p. 577–584, 1991. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1834198](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1834198)>.

ZABRISKIE, J. B.; HSU, K. C.; SEEGAL, B. C. Heart-reactive antibody associated with rheumatic fever: characterization and diagnostic significance. **Clinical and experimental immunology**, v. 7, p. 147–159, 1970.

## 4. Artigos Científicos

### 4.1. Artigo 1

#### **Primeiro estudo epidemiológico molecular de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em bovinos e búfalos de diferentes regiões do Brasil**

**Resumo:** Paratuberculose é uma doença de grande impacto econômico mundial e incurável nos ruminantes, causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Objetivou-se neste estudo realizar um estudo sobre a epidemiologia molecular do MAP, empregando a técnica de Análise de Restrição Enzimática (REA) da região IS1311 do MAP em amostras biológicas de fezes, tecido intestinal e linfonodos mesentéricos de bovinos e bubalinos de seis estados do Brasil. No total foram coletadas 109 amostras de fezes e tecidos de bovinos e bubalinos com suspeita de paratuberculose. 25 amostras foram positivas na detecção do DNA da região IS900 de MAP e foi possível tipificar 18 cepas na análise da região IS1311, sendo 100% delas identificadas como do tipo *Cattle* subtipo *Bison*. Este é o primeiro estudo da epidemiologia molecular de MAP no Brasil. Os resultados indicam que a paratuberculose está disseminada em bovinos e bubalinos em várias regiões do Brasil e demonstram que a cepa tipo *Cattle* subtipo *Bison* de MAP é a única identificada no Brasil. Estes resultados dão o suporte necessário para a implementação das estratégias de controle da paratuberculose em bovinos e bubalinos no Brasil.

**Palavras chave:** paratuberculose, diarreia, IS900, IS1311, REA.

## 1. Introdução

A paratuberculose é uma enfermidade infectocontagiosa dos animais domésticos que cursa com uma inflamação intestinal incurável crônica, principalmente nos ruminantes. É causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), um bacilo álcool ácido resistente (KENNEDY; BENEDICTUS, 2001). Devido às grandes perdas econômicas relacionadas à perda de peso, queda na produção de leite e até restrição para o transporte de animais infectados e também pela suspeita de que o MAP possa estar envolvido na doença de Crohn em seres humanos, programas de controle foram estabelecidos para reduzir a disseminação desse agente em muitos países (MENDOZA; LANA; DÍAZ-RUBIO, 2009).

No Brasil, apesar da paratuberculose ser uma enfermidade emergente e que já foi relatada em 12 estados da Federação, ainda é negligenciada pelos órgãos de controle e fiscalização, sendo de extrema importância a implementação de medidas de controle sanitário para a enfermidade no país, o que possibilitaria a melhoria da qualidade e valorização dos produtos de origem animal no mercado internacional (YAMASAKI et al., 2013; BRITO et al., 2016).

Estratégias de controle para esta enfermidade podem ser melhoradas com a identificação da cepa de MAP circulante, por ser esta uma ferramenta promissora na investigação epidemiológica para a obtenção de uma melhor compreensão da origem da infecção, identificação de fatores de risco que influenciam a transmissão, caracterização da patogênese e avaliação de programas de controle existente (MOTIWALA et al., 2006).

Com o advento das técnicas moleculares foi possível discernir com melhor precisão as estirpes de MAP, não ficando restrito apenas às características macroscópicas em cultivo (Stevenson, 2010). Com base na análise de Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP) e Análises de Restrição Enzimática (REA), as cepas de MAP foram classificadas em tipos de “Cattle (C), Sheep (S), Bison (B) e Intermediate (I)” (COLLINS; GABRIC; DE LISLE, 1990; DE LISLE; COLLINS; HUCHZERMEYER, 1992; PAVLÍK et al., 1995; PAVLIK et al., 1999; WHITTINGTON; MARSH; WHITLOCK, 2001).

Porém, estudos mais recentes de comparação de todo o genoma do MAP corroboram com a divisão de isolados de MAP em dois principais tipos: as cepas S e C.

Um dos estudos relata que, após a análise do genoma, não houve distinções que delineassem uma terceira maior linhagem, a do tipo *Intermediate* de modo que essa cepa foi agrupada como uma sub linhagem do Tipo *Sheep* (ALEXANDER; TURENNE; BEHR, 2009). As cepas do tipo *Bison* também foram classificadas como uma sub linhagem das cepas tipo *Cattle* (THIBAUT et al., 2012; STEVENSON, 2015).

No Brasil, a cepa *Cattle* foi recentemente identificada em leite de cabra, porém, não existem ainda dados sobre quais cepas de MAP circulam em bovinos e bubalinos no país (SOUZA et al., 2016).

Desta forma, objetivou-se com esta pesquisa realizar a tipificação de MAP de amostras de fezes e tecidos de bovinos e bubalinos com suspeita de paratuberculose em seis estados do Brasil, utilizando a Análise de Restrição Enzimática.

## **2. Metodologia**

### **2.1. Amostragem**

Foram coletadas 43 amostras de fezes de bovinos, das quais, 22 foram do Estado de Minas Gerais, uma da Paraíba, 12 de Pernambuco e oito de São Paulo. Além disto, foram coletadas 11 amostras de fezes de búfalos do Estado do Maranhão e 55 amostras de tecidos intestinais e linfonodos mesentéricos, sendo seis do Estado de Alagoas e 49 de Maranhão. As amostras de fezes e tecidos foram obtidas de animais com suspeita de paratuberculose e que apresentavam lesões sugestivas à necropsia ou no abate.

### **2.2. Coleta das amostras de fezes e tecidos**

As amostras de fezes dos bovinos e bubalinos foram coletadas diretamente da ampola retal, utilizando-se sacos plásticos para o armazenamento e foram identificadas e encaminhadas em caixas com gelo reciclável ao laboratório para processamento. As amostras de tecidos intestinais e linfonodos mesentéricos foram coletadas durante a inspeção *post mortem* dos bubalinos durante o abate. As alças intestinais foram abertas e aquelas que apresentavam lesões sugestivas de paratuberculose foram coletadas juntamente com os linfonodos mesentéricos adjacentes. As amostras de tecidos foram identificadas e acondicionadas em caixas com gelo reciclável e encaminhadas ao laboratório para a extração do DNA.

### **2.3. Extração do DNA das amostras**

As amostras de fezes e tecidos foram submetidas à extração de DNA utilizando-se os *kits* comerciais “QIAamp DNA Stool Mini Kit” e “QIAamp DNA Mini Kit”, respectivamente, utilizando-se o protocolo do fabricante.

#### **2.4. Detecção molecular da região IS900 do MAP**

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

#### **2.5. Tipificação do MAP**

Para a tipificação do MAP foi realizada a PCR para a região IS1311 com posterior digestão enzimática das amostras que foram positivas para a região IS900 do MAP. Para realização da PCR IS1311, o DNA foi submetido às amplificações em um volume final de 25µL contendo: 6,5µL de DNA genômico; 1µL dos primers específicos para IS1311 a 10pMol (M56: 5'- GCG TGA GGC TCT GTG GTG AA-3' e M119: 5'-ATG ACG ACC GCT TGG GAG AC-3') (MARSH; WHITTINGTON; COUSINS, 1999); 4µL de água Mili-Q ultrapura e 12,5µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega®) de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das reações foi realizado em um termociclador XP Thermal Cycler (Bioer Technology CO. LTD) com uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 37 ciclos a 94°C por 30 segundos para desnaturação, 64°C por 30 segundos para o anelamento e 72°C por 1 minuto para a extensão, com um ciclo final de 72°C por 10 minutos (KAUR et al., 2010). Então, a análise com enzimas de restrição foi realizada utilizando as enzimas HinfI e MseI como descrito por Kaur et al. (2010) e Sevilla et al. (2005) com algumas modificações. Resumidamente, o DNA para IS1311 foi submetido às enzimas de



restrição em um volume final contendo: 0,25 µl de cada enzima (10 U/ µl), 3 µl de água Mili-Q ultrapura 5µl of 10× tampão e 15 µl do produto da PCR. A mistura final será então encubada a 37°C por 2 horas em banho maria a seco. O produto da digestão foi então observado por eletroforese em gel de agarose a 4%, corados com bluegreen e visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados. Os genótipos foram então identificados pelos padrões de migração dos fragmentos descritos por Marsh et al. (1999), como observados na tabela 2.

**Tabela 1:** Tamanhos de bandas esperadas logo após a digestão pelas enzimas de restrição (HinfI e MseI) do produto de PCR da região IS1311.

Produto da PCR IS1311	Identificação da cepa	Tamanho da banda (pb)
608pb	<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i> (Sheep)	285, 323
	<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i> (Cattle)	67, 218, 285, 323
	<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i> (Bison)	67, 218, 323
	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	134, 189, 285

## 2.6. Sequenciamento das amostras para validação da PCR IS1311

Para validar as ampliações, as amostras que foram positivas na PCR da região IS1311 do MAP foram encaminhadas para o sequenciamento. As amostras foram purificadas utilizando-se o QIAquick Gel Extraction kit® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciadas bidirecionalmente por protocolos padrão usando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em um sequenciador automatizado ABI-PRISM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências foram analisadas utilizando-se a plataforma do *Basic Local Align Sequence Tool* (BLAST; [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)).

## 2.7. Comitê de Ética da Pesquisa

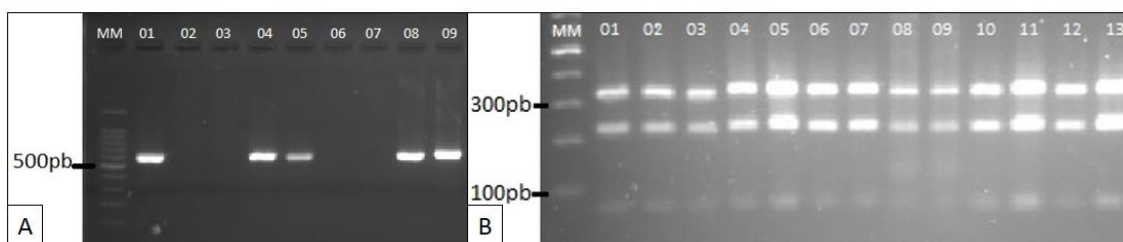
Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob a licença nº 123/2015.

## 3. Resultados

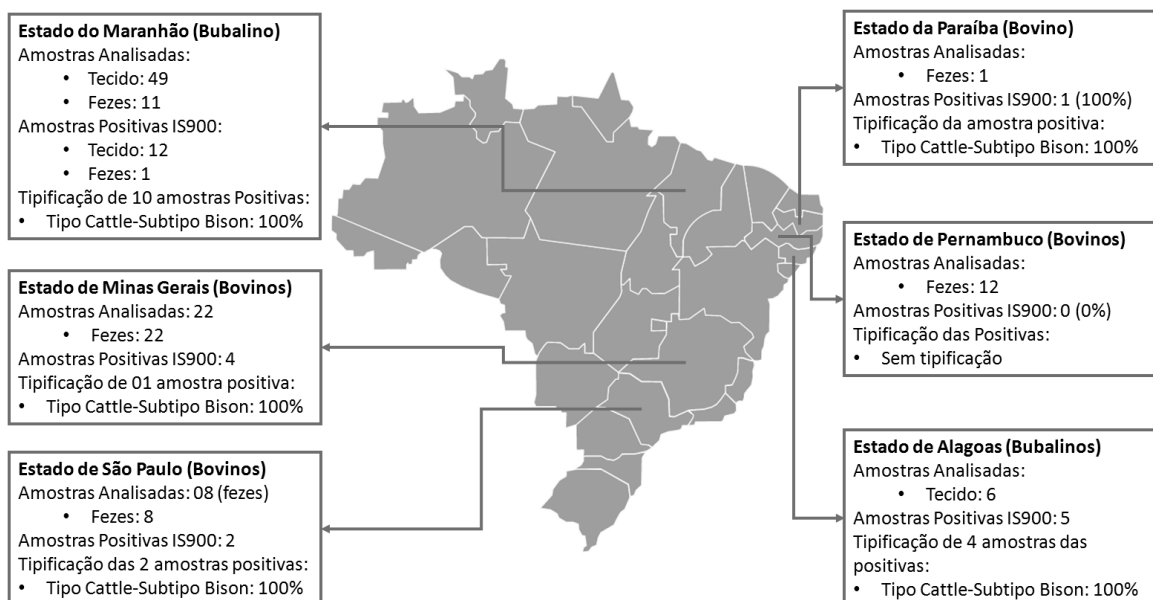
Das 43 amostras de fezes bovinas analisadas, 7 (16,27%) foram positivas na detecção do DNA da região IS900 de MAP. Dessas amostras positivas, 2 (28,57%) foram do Estado de São Paulo; 1 (14,28%) da Paraíba e 4 (57,14%) de Minas Gerais.

Em relação aos bubalinos, das 11 amostras de fezes analisadas do Estado do Maranhão, 1 (9,09%) foi positiva para a região IS900 do MAP. Na análise molecular das 55 amostras de tecidos desta espécie, 17 (30,90%) foram positivas para a detecção da região IS900 do MAP, sendo 5 (29,41%) do estado de Alagoas e 12 (70,58%) do estado do Maranhão (Figura 1).

Na análise da região IS1311 foi possível realizar a tipificação de 18 cepas das 25 positivas na PCR e 100% delas foram tipificadas como pertencentes ao tipo *Cattle*, subtipo *Bison* (Figura 1 e 2).



**Figura 1:** A – Resultado da PCR para região IS1311: MM – Marcador molecular de 100pb; 01, 04, 05, 08, 09 – Amostras positivas na reação, na altura de 608pb; 02, 03, 06, 07 – Amostras negativas na reação. B – Resultado da análise com enzimas de restrição (*HinfI* e *MseI*) do produto da PCR para região IS1311: MM – Marcador molecular; 01-13 resultado da digestão enzimática de várias amostras, resultando em três fragmentos nas alturas de 67pb, 218pb e 323pb, sendo caracterizadas como pertencentes ao tipo *Cattle*, subtipo *Bison*.



**Figura 2:** Distribuição geográfica das amostras analisadas e positivas na PCR para a região IS900 do MAP e resultado da tipificação por REA.

As 18 cepas tipificadas neste estudo foram encaminhadas para o sequenciamento molecular para validação da técnica, o que demonstrou uma similaridade que variou de

97% a 100% com uma sequência depositada no BLAST pertencente ao tipo *Cattle*, subtipo *Bison* do MAP (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolate *Bison* insertion sequence IS1311, partial sequence).

#### 4. Discussão

Paratuberculose é uma enfermidade crônica incurável dos ruminantes de grande importância para a economia causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Apesar de a paratuberculose ser uma enfermidade considerada limitada a uma ou várias regiões no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016), casos da doença já foram relatados anteriormente em bovinos em 11 estados brasileiros (YAMASAKI et al., 2013). Em relação à espécie bubalina, a paratuberculose foi recentemente diagnosticada no estado de Pernambuco por Mota et al. (2010) e desde então surgiram outros focos da enfermidade em rebanhos de outras regiões do país (DALTO et al., 2012; BRITO et al., 2016).

No Brasil, recentemente foi descrita a primeira tipificação molecular do MAP em leite caprino no município de Viçosa, MG, que também foi do tipo *Cattle*, mas não do subtipo *Bison* (SOUZA et al., 2016). É importante ressaltar que nossos resultados referentes à identificação da cepa de MAP são inéditos no Brasil para as espécies bovina e bubalina, além de abranger duas das cinco regiões do país. Esses dados são de grande impacto para a epidemiologia molecular desta enfermidade em ruminantes. As estratégias de controle podem ser implementadas pelos órgãos oficiais do Ministério da Agricultura para evitar a disseminação desta bactéria para outras áreas do país. Estes resultados também dão suporte para uma melhor compreensão sobre a origem da infecção, a identificação de fatores de risco que influenciam a transmissão e caracterização da patogênese (MOTIWALA et al., 2006).

Boa parte dos estudos anteriores indicou que as cepas tipo *Cattle* de MAP eram as mais encontradas em bovinos em países da Oceania, América do Norte e América do Sul (COLLINS; GABRIC; DE LISLE, 1990; WHIPPLE; KAPKE; VARY, 1990; MOREIRA et al., 1999; COUSINS et al., 2000; WHITTINGTON et al., 2000). A cepa do tipo *Sheep*, mesmo que em menor frequência, também tem sido relatada na América do Sul como a Argentina (TRAVERÍA et al., 2013).

O fato de todas as cepas deste estudo terem sido identificadas como pertencentes ao tipo C subtipo *Bison* sugere que esta cepa pode ter sido introduzida no Brasil por rebanhos importados da Índia, pois, historicamente foram realizadas introduções de bovinos e bubalinos da Índia para o Brasil. Na Índia, a principal cepa de MAP que acomete a espécie bovina pertence também ao subtipo *Bison* (DOMINGUES, 1966; ZAVA, 1984; SONAWANE; NARNAWARE; TRIPATHI, 2016). Porém, estudos mais aprofundados sobre a origem desta cepa no Brasil devem ser realizados para comprovar essa teoria.

O método de PCR-RFLP IS900 é o mais utilizado para a diferenciação entre linhagens de MAP em bovinos e ovinos, porém, é um método complexo, caro e que requer uma grande quantidade de material genético (COLLINS; GABRIC; DE LISLE, 1990). Já a PCR-REA da região IS1311 do MAP permite uma rápida diferenciação entre os tipos *Cattle*, *Sheep* e subtipo *Bison* devido às mutações pontuais estáveis nessa sequência de inserção (MARSH; WHITTINGTON; COUSINS, 1999; WHITTINGTON et al., 2001; WHITTINGTON; MARSH; WHITLOCK, 2001).

Janagama et al. (2006) e Motiwala et al. (2006) relataram que as cepas tipo *Cattle* do MAP são capazes de produzir uma resposta imune no hospedeiro que estimulam as vias anti-inflamatórias e anti-apoptóticas, diferente das cepas do tipo *Sheep*, que geralmente induzem uma resposta pró-inflamatória em macrófagos. Outros estudos indicam que as cepas do tipo *Sheep* causam lesões mais severas no hospedeiro quando comparadas com o tipo *Cattle* que acomete principalmente os tecidos linfáticos intestinais; este estudo sugere ainda que, diferente do tipo *Sheep*, as cepas do tipo *Cattle* possuem um crescimento mais lento e localizado na infecção inicial (VERNA et al., 2007). Essas informações ajudam a justificar o motivo pelo qual a cepa tipo *Cattle* é majoritariamente identificada, pois, esta consegue ocasionar a infecção e persistir no hospedeiro de forma subclínica por mais tempo. Desta forma, o microrganismo pode se multiplicar no animal infectado e se disseminar por um período maior de tempo até sua identificação para que medidas possam ser tomadas.

Acredita-se, ainda, que o risco de transmissão natural de cepas de tipo *Sheep* de ovelhas e cabras para bovinos seja baixo e provavelmente só ocorre quando os animais suscetíveis são expostos a altas doses infectantes (MOLONEY; WHITTINGTON, 2008). Já as cepas de MAP tipo *Cattle* não demonstram predileção por hospedeiro e

podem ser isoladas de uma variedade de espécies selvagens e domésticas, cativas e de vida livre, incluindo os não ruminantes (GHADIALI et al., 2004; MOTIWALA et al., 2004; HUTCHINGS et al., 2010). Vale ressaltar que o uso dos termos tipo *Cattle* e tipo *Sheep* não implicam na especificidade absoluta de hospedeiro, uma vez que ambos os tipos foram isolados, pelo menos ocasionalmente, de todos os hospedeiros comuns de ruminantes, mas a designação tem utilidade epidemiológica em muitas situações (WHITTINGTON et al., 2000).

Apesar das controvérsias sobre o envolvimento do MAP na saúde pública, existe a suspeita de que esta bactéria esteja envolvida na doença de Crohn em humanos e caso exista de fato esta relação, os achados deste trabalho merecem atenção também nesse aspecto, pois, a grande maioria dos isolados de MAP provenientes de humanos com doença de Crohn foram tipificadas como pertencentes ao tipo *Cattle* (WHITTINGTON et al., 2000; GHADIALI et al., 2004; PAUSTIAN et al., 2008; NASER et al., 2014).

Embora ainda seja difícil determinar se o fenótipo da infecção pelo MAP relaciona-se ao tipo de cepa ou à espécie acometida, existem evidências suficientes para concluir que o tipo de cepa do MAP influencia na interação patógeno-hospedeiro e no desenvolvimento da enfermidade. Então, a variabilidade genética de diferentes cepas de MAP e sua influência na infecção e na patogênese têm importantes implicações para o diagnóstico e controle da doença. Vale ressaltar que, uma vez que as cepas de MAP não são espécie-específicas, é importante a capacidade de detectar e controlar a infecção por qualquer tipo de cepa, tanto em uma única espécie como em outras espécies suscetíveis (STEVENSON, 2015).

## **5. Conclusão**

Este é o primeiro estudo da epidemiologia molecular de MAP no Brasil. Os resultados indicam que a paratuberculose está disseminada em bovinos e bubalinos em várias regiões do Brasil e demonstram que a cepa tipo *Cattle* subtipo *Bison* de MAP é a única identificada no Brasil. Estes resultados dão o suporte necessário para a implementação das estratégias de controle da paratuberculose em bovinos e bubalinos no Brasil.

## **6. Referência bibliográficas**

ALEXANDER, D. C.; TURENNE, C. Y.; BEHR, M. A. Insertion and deletion events

that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 3, p. 1018–1025, 2009.

BRITO, M. F.; DOS SANTOS BELO-REIS, A.; BARBOSA, J. D.; UBIALI, D. G.; DE CASTRO PIRES, A. P.; DE MEDEIROS, E. S.; DE MELO, R. P. B.; DE ALBUQUERQUE, P. P. F.; YAMASAKI, E.; MOTA, R. A. Paratuberculosis in buffaloes in Northeast Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 7, p. 1497–1501, 2016.

COLLINS, D. M.; GABRIC, D. M.; DE LISLE, G. W. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1591–1596, 1990.

COUSINS, D. V.; WILLIAMS, S. N.; HOPE, A. F.; EAMENS, G. J. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using IS900 RFLP. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, n. 0005–0423, p. 184–190, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10860159>>.

DALTO, A. C.; BANDARRA, P. M.; PAVARINI, S. P.; BOABAID, F. M.; DE BITENCOURT, A. P. G.; GOMES, M. P.; CHIES, J.; DRIEMEIER, D.; DA CRUZ, C. E. F. Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 8, p. 1899–1904, 2012.

DE LISLE, G. W.; COLLINS, D. M.; HUCHZERMEYER, H. F. Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 2, p. 163–165, 1992. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1325047](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1325047)>.

DOMINGUES, O. **O Gado Indiano no Brasil**. Rio de Janeiro - RJ: Planam e Sunab, 1966.

GHADIALI, A. H.; STROTHER, M.; NASER, S. A.; MANNING, E. J. B. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains Isolated from Crohn's Disease Patients and Animal Species Exhibit Similar Polymorphic Locus Patterns. **Society**, v. 42, n. 11, p. 5345–5348, 2004.

HUTCHINGS, M. R.; STEVENSON, K.; GREIG, A.; DAVIDSON, R.; MARION, G.; JUDGE, J. Infection of non-ruminant wildlife by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: BEHR, M. A.; COLLINS, D. M. (Ed.). **Paratuberculosis - Organism, Disease, Control**. Cambridge: CAB International, 2010. p. 188–200.

JANAGAMA, H. K.; JEONG, K. il; KAPUR, V.; COUSSENS, P.; SREEVATSAN, S. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 1471–2180 (Electronic), p. 10, 2006. Disponível em: <file:///C:/My Documents/Papers/Janagama et al 2006 BMC Microbiology 6 (10).pdf%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1382238&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

KAUR, P.; FILIA, G.; SINGH, S. V.; PATIL, P. K.; SANDHU, K. S. Molecular detection and typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from milk samples of dairy animals. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n. 5, p. 1031–1035, 2010.

KENNEDY, D. J.; BENEDICTUS, G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. **Revue Scientifique Et Technique**, v. 20, n. 1, p. 151–179, 2001.

MARSH, I.; WHITTINGTON, R.; COUSINS, D. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, n. 2, p. 115–126, 1999. Disponível em: <papers3://publication/uuid/9C9D0064-000B-43AB-BCE7-86E82AFFB1B2>.

MENDOZA, J. L.; LANA, R.; DÍAZ-RUBIO, M. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and its relationship with Cronh's disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 4, p. 417–422, 2009.

MOLONEY, B. J.; WHITTINGTON, R. J. Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: An estimate of prevalence in exposed susceptible cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 86, n. 4, p. 117–123, 2008.

MOREIRA, A. R.; PAOLICCHI, F.; MORSELLA, C.; ZUMARRAGA, M.;

CATALDI, A.; FABIANA, B.; ALICIA, A.; PIET, O.; DICK, V. S.; MARÍA ISABEL, R. Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 70, n. 3–4, p. 251–259, 1999.

MOTA, R. A.; PEIXOTO, P. V.; YAMASAKI, E. M.; DE MEDEIROS, E. S.; DA COSTA, M. M.; PEIXOTO, R. M.; BRITO, M. F. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 237–242, 2010.

MOTIWALA, A. S.; JANAGAMA, H. K.; PAUSTIAN, M. L.; ZHU, X.; BANNANTINE, J. P.; KAPUR, V.; SREEVATSAN, S. Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with diverse genotypes. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6046–6056, 2006.

MOTIWALA, A. S. S.; AMONSIN, A.; STROTHER, M.; MANNING, E. J. B. J.; KAPUR, V.; SREEVATSAN, S. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 0095–1137, p. 1703–1712, 2004. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/42/4/1703>>.

NASER, S. A.; SAGRAMSINGH, S. R.; NASER, A. S.; THANIGACHALAM, S. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 23, p. 7403–7415, 2014.

PAUSTIAN, M. L.; ZHU, X.; SREEVATSAN, S.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; KAPUR, V.; BANNANTINE, J. P. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species. **BMC genomics**, v. 9, p. 135, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18366709>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2323391>>.

PAVLÍK, I.; BEJČKOVÁ, L.; PAVLAS, M.; ROZSYPALOVÁ, Z.; KOSKOVÁ, S. Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium*



paratuberculosis isolated in various localities. **Veterinary Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 311–318, 1995.

PAVLIK, I.; HORVATHOVA, a; DVORSKA, L.; BARTL, J.; SVASTOVA, P.; DU MAINE, R.; RYCHLIK, I. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. **Journal of microbiological methods**, v. 38, n. 1–2, p. 155–167, 1999.

SEVILLA, I.; SINGH, S. V.; GARRIDO, J. M.; ADURIZ, G.; RODRÍGUEZ, S.; GEJO, M. V.; WHITTINGTON, R. J.; SAUNDERS, V.; WHITLOCK, R. H.; JUSTE, R. A. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. **Revue Scientifique Et Technique**, v. 24, n. January 2006, 2005.

SONAWANE, G. G.; NARNAWARE, S. D.; TRIPATHI, B. N. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in ruminants in different parts of India. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, n. 1, p. 3–9, 2016.

SOUZA, M. C. C.; LIMA, M. C.; DE FREITAS ESPESCHIT BRAGA, I.; SCHWARZ, D. G. G.; DE SOUZA RODRIGUES, A. P.; SALES, E. B.; JUNIOR, A. A. F.; MOREIRA, M. A. S. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) isolated from dairy goats in Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 140, p. 18–21, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448816301201>>.

STEVENSON, K. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and the influence of strain type on infection and pathogenesis: A review. **Veterinary Research**, p. 1–13, 2015. Disponível em: <??>.

TADDEI, R.; BARBIERI, I.; PACCIARINI, M. L.; FALLACARA, F.; BELLETTI, G. L.; ARRIGONI, N. *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: Implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3–4, p. 338–347, 2008.

THIBAUT, V.; BRYANT, J.; HARRIS, S.; BENTLEY, S.; SMITH, D.; MCLUCKIE, J.; PARKHILL, J.; STEVENSON, K. Genome sequencing to identify phylogenetic

diversity and single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. In: Proceedings of the Eleventh International Colloquium on Paratuberculosis, Sydney. **Anais...** Sydney: International Association for Paratuberculosis, 2012.

TRAVERÍA, G. E.; ZUMARRAGA, M.; ETCHECHOURY, I.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; ALVARADO PINEDO, M. F.; PAVLIK, I.; PRIBYLOVA, R.; ROMERO, J. R. First identification of *Mycobacterium avium* paratuberculosis sheep strain in Argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 897–899, 2013.

VERNA, A. E.; GARCIA-PARIENTE, C.; MUÑOZ, M.; MORENO, O.; GARCÍA-MARIN, J. F.; ROMANO, M. I.; PAOLICCHI, F.; PÉREZ, V. Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Zoonoses and Public Health**, v. 54, n. 6–7, p. 243–252, 2007.

WHIPPLE, D.; KAPKE, P.; VARY, C. Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 11, p. 2561–2564, 1990. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1979332](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1979332)>.

WHITTINGTON, R. J.; HOPE, A. F.; MARSHALL, D. J.; TARAGEL, C. A.; MARSH, I. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3240–3248, 2000.

WHITTINGTON, R. J.; MARSH, I. B.; WHITLOCK, R. H. Typing of IS 1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. **Molecular and cellular probes**, v. 15, n. 3, p. 139–45, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890850801903469>>.

WHITTINGTON, R. J.; TARAGEL, C. A.; OTTAWAY, S.; MARSH, I.; SEAMAN, J.; FRIDRIKSDOTTIR, V. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of

occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. **Veterinary Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 311–322, 2001.

YAMASAKI, E. M.; BRITO, M. F.; MOTA, R. A.; MCINTOSH, D.; TOKARNIA, C. H. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 127–140, 2013.

ZAVA, M. **Produção de Búfalos**. Campinas - SP: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1984.

## 4.2. Artigo 2

### **Ocorrência de DNA de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em queijo tipo coalho no Estado de Pernambuco, Brasil**

**Resumo:** Paratuberculose é uma doença crônica, incurável e que afeta os ruminantes e outros animais domésticos. É causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) que também pode estar envolvido em algumas enfermidades nos humanos como a doença de Crohn, diabetes tipo 1, sarcoidose, esclerose múltipla e tireoidite de Hashimoto. Objetivou-se neste estudo investigar a ocorrência de DNA de MAP em amostras de queijo tipo coalho artesanal adquiridas no Estado de Pernambuco. Foram analisadas quarenta amostras de queijo tipo coalho submetidas à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para detecção da região IS900 de MAP. 11 (27,5%) foram positivas com média de 19,35 células de MAP para cada 20 mg de amostra, com um mínimo de 3,1 UFC e um máximo de 32 UFC. Assim, este tipo de queijo que é um dos mais consumidos nesta região do Brasil constitui uma fonte de exposição humana ao MAP. Outras pesquisas nesta área devem ser realizadas para avaliar a viabilidade da bactéria neste tipo de queijo.

**Palavras chave:** IS900, qPCR, paratuberculose, bovino

## **1. Introdução**

A paratuberculose é uma doença insidiosa que afeta principalmente os ruminantes domésticos e selvagens e é causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (KENNEDY; BENEDICTUS, 2001). Existe a suspeita que, em humanos, o MAP possa estar associado ao desenvolvimento de algumas enfermidades, pois a exposição humana ao MAP foi identificada como um potencial fator de risco para indivíduos geneticamente suscetíveis à doença de Crohn (SECHI; DOW, 2015).

Também surgiram suspeitas de que o MAP possa estar envolvido em outras importantes doenças no homem como a sarcoidose (BROWNELL et al., 2011), síndrome de Blau (DOW; ELLINGSON, 2010) e diabetes tipo 1 (RANI; SECHI; AHMED, 2010).

Esta bactéria tem sido relatada em diversos tipos de alimentos, como carne (ALONSO-HEARN et al., 2009), leite pasteurizado (GRANT; BALL; ROWE, 2002), fórmula infantil (HRUSKA et al., 2011) e queijos (STEPHAN et al., 2007). Devido à suspeita do envolvimento de MAP na doença de Crohn, o leite e seus subprodutos receberam maior atenção como fonte de infecção de MAP para humanos por serem considerados possíveis veículos de transmissão desta bactéria do animal para o homem (CORTI; STEPHAN, 2002). O microrganismo pode ser eliminado no leite de animais infectados, ou, ainda porque o leite cru também pode ser contaminado com material fecal que contenha MAP (STABEL; WELLS; WAGNER, 2002; DONAGHY; JOHNSTON; ROWE, 2011).

No Estado de Pernambuco, a paratuberculose já foi relatada em alguns estudos acometendo bovinos (MOTA et al., 2007; SÁ et al., 2013) e bubalinos (MOTA et al., 2010) em propriedades leiteiras. A presença do DNA também já foi detectada em amostras de leite de vacas provenientes de várias propriedades no mesmo Estado (ALBUQUERQUE et al., 2017).

Considerando o risco de consumo de derivados de leite como risco de infecção de humanos por MAP, objetivou-se neste estudo investigar a ocorrência do DNA de MAP em amostras de queijo tipo coalho na região nordeste do Brasil.

## **2. Metodologia**

### **2.1. Amostragem**

Foram analisadas quarenta amostras de queijo tipo coalho artesanal adquiridas em estabelecimentos comerciais como padarias, supermercados e mercados públicos na microrregião de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. As amostras foram encaminhadas ao laboratório em um caixa de isopor contendo gelo reciclável no mesmo dia da coleta em suas embalagens originais.

## **2.2. Extração de DNA**

Foram pesados 10g de queijo e macerados em 20 mL de solução salina estéril a 0,9% em saco estéril. As extrações de DNA foram realizadas com 20 mg do material macerado usando o kit comercial *Wizard SV Genomic DNA Purification System* (Promega®), seguindo as instruções do fabricante.

## **2.3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)**

Após as extrações dos DNAs, as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25,0µL contendo: 5µL de DNA genômico; 1µL dos primers específicos para IS900 a 10µM (DF: 5'-GACGACTCGACCGCTAATTG-3' e o DR-1: 5'-CCGTAACCGTCATTGTCCAG-3'); 5,5µL de Água mili-Q ultrapura e 12,5µL de *QuantiFast SYBR Green PCR Kit* (mistura para PCR - QIAGEN®) de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das etapas de reações foi realizado em um termociclador *Rotor-Gene Q* (QIAGEN) com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos a 95°C por 20 segundos e 60°C por 30 segundos. Foi utilizado o software "*Rotor-Gene Q Software v1.7*" para acompanhamento e realização da interpretação dos resultados da qPCR.

O DNA de uma cepa de MAP fornecida pelo Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais identificado como "Nakajima1991" foi utilizada para padronizar a reação como controle positivo da qPCR.

A curva de desnaturação (*melting curve*) consistiu em 65°C por 90 segundos para a preparação, com posterior aumento gradual de 0,1°C a cada 2 segundos de 75° a 90°C. O número de cópias do fragmento foi determinado com metodologia descrita por Rodríguez-Lázaro et al. (2005). O número de cópias foi então dividido por 15, o que corresponde à média de cópias da região IS900 encontradas no genoma do MAP (KRALIK et al., 2011). O DNA do MAP foi diluído em série na base 10 para obtenção da curva padrão, na qual foi possível detectar de  $2.12 \times 10^7$  até 21 células do MAP. A eficiência dos iniciadores foi de 100% e o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) foi

0,99850. O valor do limiar de detecção (*Threshold – Ct*) ficou entre 9,46 e 26,43 com o pico de desnaturação em 83,4°C. As reações foram realizadas em duplicatas. Por último, os números de cópias nas amostras positivas foram quantificados utilizando-se como referência a curva padrão obtida.

## 2.4. Sequenciamento

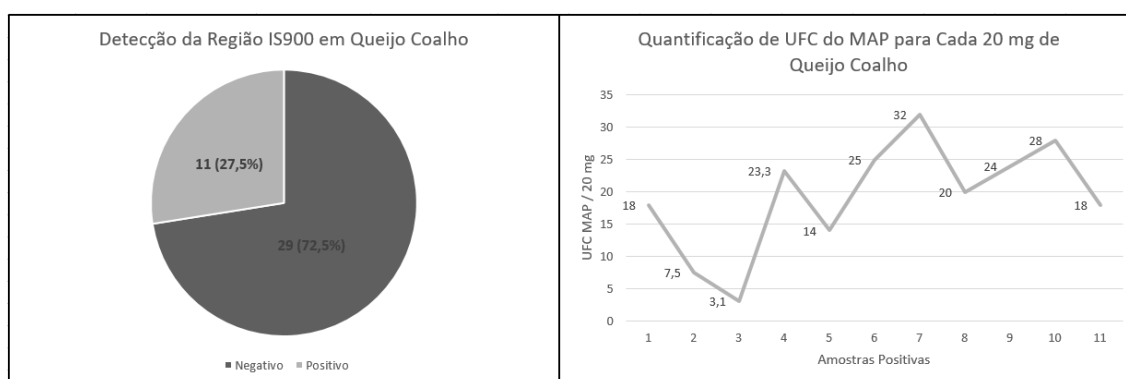
Para validar as amplificações, amostras positivas na qPCR para a região IS900 do MAP foram encaminhadas para o sequenciamento. As amostras foram sequenciadas bidirecionalmente utilizando protocolo padrão usando o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)* em um sequenciador automatizado ABI-PRISM 3130 (*Applied Biosystems*). As sequências foram analisadas utilizando-se a plataforma do *Basic Local Align Sequence Tool (BLAST; www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)*.

## 2.5. – Comitê de ética

O Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco aprovou os procedimentos desta pesquisa com licença no. 123/2015.

## 3. Resultados

Das 40 amostras de queijo tipo coalho analisadas, 11 (27,5%) foram positivas para a região IS900 de MAP na qPCR. Na quantificação dessas amostras foi possível determinar que em média foram detectadas 19,35 células de MAP para cada 20 mg de amostra, com um mínimo de 3,1 UFC e um máximo de 32 UFC.



**Figura 1:** A - Percentual de amostras positivas para a região IS900 de MAP; B – Quantificação das UFC de MAP em cada amostra de queijo positiva.

O resultado do sequenciamento das amostras confirmou que o material amplificado apresentou similaridade de 98% com a sequência do MAP depositada no BLAST (*MAP4 Complete Genoma*).

#### 4. Discussão

O queijo tipo coalho é um produto bastante consumido e faz parte da cultura da Região Nordeste. Seu processo de fabricação é regido por lei Estadual, podendo ser utilizado leite cru integral fresco na confecção artesanal desse queijo (PERNAMBUCO, 2018). Porém, a utilização de leite sem tratamento térmico pode colocar em risco a saúde do consumidor (DIAS et al., 2015).

A presença de MAP em queijos foi anteriormente relatada em alguns estudos no mundo (STEPHAN et al., 2007; BOTSARIS et al., 2010; WILLIAMS; WITHERS, 2010). No Brasil, o DNA bacteriano foi detectado em amostras de queijo tipo coalho no Estado do Piauí, por meio da técnica de PCR para detecção da região IS900 do MAP, resultando em 3 (10%) amostras positivas (FARIA et al., 2014).

No nosso estudo detectou-se uma frequência maior de ocorrência do DNA de MAP nas amostras de queijo tipo coalho, talvez devido a influência da área onde estas amostras foram coletadas. No estado de Pernambuco, a paratuberculose tem sido relatada com certa frequência em bovinos (Mota et al., 2007; Sá et al., 2013), inclusive, seu DNA foi detectado em amostras de leite na microrregião de Garanhuns (ALBUQUERQUE et al., 2017). É importante destacar também que a técnica da qPCR utilizada no nosso estudo possui uma maior sensibilidade e especificidade na detecção desse microrganismo quando comparada à PCR convencional, possuindo também a capacidade de quantificar as bactérias (MACKAY, 2004).

Um estudo anterior realizado por Albuquerque et al. (2017) em rebanhos leiteiros da microrregião de Garanhuns onde foram detectados alguns focos de paratuberculose foi quantificada uma média de 160 UFC/ml de MAP nas amostras de leite de vacas positivas. Neste estudo, o número de UFC em 20 mg de queijo foi inferior (média de 19,35), podendo ser justificado pelo fato de o leite de vacas positivas utilizado para produção do queijo estar diluído com leite de animais negativos. Mesmo considerando uma menor quantidade de MAP nas amostras de queijo, existe a possibilidade de infecção dos consumidores pelo consumo deste queijo caso esta bactéria esteja viável na amostra. Experimentalmente foi verificado que esta micobactéria pode sobreviver a processamentos térmicos que simulam a pasteurização



(SUNG; COLLINS, 1998). Uma pesquisa experimental relatou que microrganismos MAP isolados de pacientes com a doença de Crohn apresentaram uma resistência térmica maior quando comparado com isolados de animais (CHIODINI; HERMON-TAYLOR, 1993).

O queijo coalho pernambucano possui em média um pH em torno de 5,35 e concentração de sal que varia de 0,8% a 1% (SENA et al., 2000) e um problema na fabricação deste queijo artesanal é o leite utilizado que não passa por um tratamento térmico (ALMEIDA; JÚNIOR; GUERRA, 2013). Estas características intrínsecas deste tipo de queijo favorecem o tempo de sobrevivência de MAP (SUNG; COLLINS, 2000). Inclusive, a sobrevivência desse microrganismo já foi relatada em um isolado realizado proveniente de queijo tipo coalho (FARIA et al., 2014).

Os estudos envolvendo os fatores de risco para o desenvolvimento da doença de Crohn apresentam resultados discordantes, pois alguns não encontraram uma associação entre o microrganismo e a enfermidade em humanos e outros encontraram associação entre a doença e o consumo de carne e queijos processados (WADDELL et al., 2016). No entanto, como os animais são a principal fonte de infecção, a transmissão de MAP dos animais infectados para os humanos seria a forma mais provável (COLLINS, 1997).

Enquanto não existe uma resposta definitiva sobre o envolvimento de MAP em enfermidades no homem, é importante realizar pesquisas para detectar esse microrganismo em alimentos, pois, caso se confirme essa relação já existirão dados epidemiológicos que poderão auxiliar no controle, além de que, esses resultados ainda podem servir de indicadores para possíveis rebanhos infectados na região de origem das amostras.

## **5. Conclusão**

Conclui-se que este tipo de queijo que é um dos mais consumidos nesta região do Brasil constitui uma fonte de exposição humana ao MAP. Outras pesquisas nesta área devem ser realizadas para avaliar a viabilidade da bactéria neste tipo de queijo.

## **6. Referência Bibliográficas**

ALBUQUERQUE, P. P. F. de; SANTOS, A. de S.; SOUZA NETO, O. L. de; KIM, P.

de C. P.; CAVALCANTI, E. F. T. S. F.; OLIVEIRA, J. M. B. de; MOTA, R. A.; JÚNIOR, J. W. P. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk from the state of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 113–117, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.010>>.

ALMEIDA, S. L.; JÚNIOR, F. G. P.; GUERRA, J. R. F. Representação da Produção e Consumo do Queijo. **Revista Interdisciplinar de Gestão Social**, v. 2, n. 2, p. 37–58, 2013.

ALONSO-HEARN, M.; MOLINA, E.; GEJO, 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**, v. 6, n. 4, p. 513–518, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19415976>%5Cn[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19415976](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19415976)>.

BOTSARIS, G.; SLANA, I.; LIAPI, M.; DODD, C.; ECONOMIDES, C.; REES, C.; PAVLIK, I. Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. SUPPL., p. 87–90, 2010.

BROWNELL, I.; RAMÍREZ-VALLE, F.; SANCHEZ, M.; PRYSTOWSKY, S. Evidence for mycobacteria in sarcoidosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 45, n. 5, p. 899–905, 2011.

CHIODINI, R. J.; HERMON-TAYLOR, J. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 629–631, 1993. Disponível em: <<http://jvdi.org>>.

COLLINS, M. T. *Mycobacterium paratuberculosis*: A Potential Food-Borne Pathogen? **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 12, p. 3445–3448, 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030297763215>>.

CORTI, S.; STEPHAN, R. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. **BMC Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 1,

2002. Disponível em: <<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-2-15>>.

DIAS, J. do N.; LIMA, F. L.; MACHADO, S. M. de O.; OLIVEIRA, J. S. de; FERREIRA, G. P.; PEREIRA, A. C. T. da C. Avaliação das Condições Higiênico-Sanitárias de Leite Cru e Queijo Coalho. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 2, p. 277–284, 2015.

DONAGHY, J. A.; JOHNSTON, J.; ROWE, M. T. Detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in cheese, milk powder and milk using IS900 and f57-based qPCR assays. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 2, p. 479–489, 2011.

DOW, C. T.; ELLINGSON, J. L. E. Detection of *Mycobacterium avium* ss. *Paratuberculosis* in Blau Syndrome Tissues. **Autoimmune Diseases**, v. 2010, p. 1–5, 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ad/2010/127692/>>.

FARIA, A. C. S.; SCHWARZ, D. G. G.; CARVALHO, I. A.; ROCHA, B. B.; DE CARVALHO CASTRO, K. N.; SILVA, M. R.; MOREIRA, M. A. S. Short communication: Viable *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in retail artisanal Coalho cheese from Northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4111–4114, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214003257>>.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2428–2435, 2002.

HRUSKA, K.; SLANA, I.; KRALIK, P.; PAVLIK, I. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: F57 competitive real time PCR. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 5, p. 226–230, 2011.

KENNEDY, D. J.; BENEDICTUS, G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. **Revue Scientifique Et Technique**, v. 20, n. 1, p. 151–179, 2001.

KRALIK, P.; SLANA, I.; KRALOVA, A.; BABAK, V.; WHITLOCK, R. H.; PAVLIK, I. Development of a predictive model for detection of *Mycobacterium avium* subsp.

*paratuberculosis* in faeces by quantitative real time PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 1–2, p. 133–138, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.009>>.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 3, p. 190–212, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>>.

MOTA, R. A.; PEIXOTO, P. V.; YAMASAKI, E. M.; DE MEDEIROS, E. S.; DA COSTA, M. M.; PEIXOTO, R. M.; BRITO, M. F. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 237–242, 2010.

MOTA, R.; PINHEIRO JUNIOR, J.; GOMES, M.; PEIXOTO, R.; MAIA, F.; BRITO, M.; CHIES, J.; SNEL, G.; BERCHT, B.; JUFFO, G. Paratuberculose Em Um Rebanho Bovino Leiteiro No Estado De Pernambuco, Pe. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 2, p. 73–79, 2007. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74\\_2/mota.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74_2/mota.pdf)>.

[CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]

RANI, P. S.; SECHI, L. a; AHMED, N. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as a trigger of type-1 diabetes: destination Sardinia, or beyond? **Gut pathogens**, v. 2, p. 1, 2010.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; D'AGOSTINO, M.; HERREWEGH, A.; PLA, M.; COOK, N.; IKONOMOPOULOS, J. Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 93–104, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160504005343>>.

SÁ, L. D. M.; OLIVEIRA, J. M. B. De; SANTOS, G. R.; BRANDESPIM, D. F.; JÚNIOR, J. L. S.; MOTA, R. A.; M, A. S. L.; OLIVEIRA, J. M. B.; SANTOS, G. R.; BRANDESPIM, D. F.; MOTA, R. A. Avaliação sorológica e de fatores de risco para a infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em rebanhos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 310–313, 2013.

SECHI, L. A.; DOW, C. T. *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* Zoonosis - The

Hundred Year War - Beyond Crohn's Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAR, p. 1–8, 2015.

SENA, M. J.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; MORAIS, C. F. de A.; CORRÊA, E. S.; SOUZA, M. R. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em Recife, PE. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 74, p. 41–44, 2000.

STABEL, J. R.; WELLS, S. J.; WAGNER, B. A. Relationships Between Fecal Culture, ELISA, and Bulk Tank Milk Test Results for Johne's Disease in US Dairy Herds. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 3, p. 525–531, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030202741040>>.

STEPHAN, R.; SCHUMACHER, S.; TASARA, T.; GRANT, I. R. Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 8, p. 3590–3595, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0015>>.

SUNG, N.; COLLINS, M. T. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 999–1005, 1998.

SUNG, N.; COLLINS, M. T. Effect of Three Factors in Cheese Production (pH, Salt, and Heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1334–1339, 2000.

WADDELL, L.; RAJIĆ, A.; STÄRK, K.; MCEWEN, S. A. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping review of the existing evidence. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 132, p. 32–48, 2016.

WILLIAMS, A. G.; WITHERS, S. E. Microbiological characterisation of artisanal farmhouse cheeses manufactured in Scotland. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 3, p. 356–369, 2010.

### 4.3. Artigo 3

#### **Ocorrência de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viável do tipo *Cattle* subtipo *Bison* em queijo coalho de búfala proveniente de Alagoas, Brasil**

**Resumo:** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) é o agente etiológico da doença da paratuberculose. Neste estudo identificou-se pela primeira vez no Brasil por meio da técnica de isolamento e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a presença de MAP viável em queijo tipo coalho de búfala. Posteriormente, para a tipificação do isolado realizou-se a técnica de Análise de Restrição Enzimática (REA) da região IS1311 do MAP que identificou o tipo *Cattle* subtipo *Bison*. Este resultado até então inédito no Brasil auxilia em estratégias de controle de MAP em alimentos, visto que esse microrganismo é suspeito de estar envolvido com enfermidades nos humanos.

**Palavras chave:** búfalos, paratuberculose, tipificação, IS1311, isolamento.

## **2. Introdução**

A doença de Johne, também conhecida por paratuberculose, é uma inflamação intestinal crônica causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Essa enfermidade afeta principalmente ruminantes, mas já foi descrito acometendo várias outras espécies animais, incluindo as selvagens (MANNING, 2001).

Assim, a paratuberculose é responsável por sérias consequências econômicas e de saúde animal em todo o mundo (BENEDICTUS; DIJKHUIZEN; STELWAGEN, 1987; OTT; WELLS; WAGNER, 1999). O MAP também é de interesse na saúde pública devido ao seu possível envolvimento na doença de Crohn em humanos que é doença debilitante crônica de etiologia desconhecida e que apresenta uma patologia semelhante à doença de Johne (SECHI; DOW, 2015).

Embora existam muitas dúvidas sobre as condições em que a doença em seres humanos possa se desenvolver, é fundamental compreender melhor o risco de exposição humana ao MAP de várias fontes, incluindo o contato direto com animais, o meio ambiente e o consumo de alimentos potencialmente contaminados (WADDELL et al., 2016).

Objetivou-se neste estudo relatar pela primeira vez no Brasil, a ocorrência de MAP viável em amostra de queijo tipo coalho de búfala.

## **3. Metodologia**

### **3.1. Amostra**

Duas amostras da mesma marca de queijo tipo coalho pasteurizado de búfala foram coletadas em um estabelecimento comercial localizado no Estado de Alagoas, Brasil. As amostras foram armazenadas em temperatura de refrigeração e encaminhadas ao laboratório para análise microbiológica e molecular.

### **3.2. Descontaminação e cultivo para isolamento do MAP**

Para descontaminação utilizou-se o protocolo descrito por Faria et al. (2014) com algumas modificações. Resumidamente, o exterior da embalagem dos queijos foi descontaminada com álcool 70% com posterior exposição à luz ultravioleta por 30 minutos. Em seguida foram pesadas 30g de queijo de cada amostra e colocado em sacos do tipo “zip locker” previamente esterilizados. Adicionou-se 125 ml de solução de NaCl a 1% e por ação mecânica o queijo foi homogeneizado e macerado. A amostra foi

colocada em banho maria por 30 minutos a 37°C. Em seguida, 30 ml da suspensão foi transferida para um tubo do tipo “falcon” de 50 ml e centrifugado a 3000 RPM por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso em 10 ml de solução de *hexadecyl pyridinium chloride* (HPC) a 0,75%. Logo após, as amostras foram deixadas em sala escura à temperatura ambiente por 5 horas e novamente centrifugadas a 3000 RPM por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 1 ml de PBS pH 7,2 esterilizado; alíquotas de 250 µL foram distribuídas em duplicata no meio de cultura Löwenstein Jensen enriquecido com Micobactina J, incubados em estufa a 37°C e observados semanalmente durante 3 meses.

### **3.3. Extração do DNA das amostras**

Colônias suspeitas foram coletadas, diluídas em 200 µL de PBS pH 7,2 esterilizado e submetidas à extração de DNA utilizando-se o kit comercial “*QIAamp DNA Mini Kit*”, utilizando-se o protocolo do fabricante.

### **3.4. Detecção molecular da região IS900 do MAP**

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

### **3.5. Tipificação do MAP**

Para a tipificação do MAP foi realizada a PCR para a região IS1311 com posterior digestão enzimática das amostras positivas para a região IS900 do MAP. Para realização da PCR IS1311, o DNA foi submetido às amplificações em um volume final de 25µL contendo: 6,5µL de DNA genômico; 1µL dos primers específicos para IS1311 a 10pMol (M56: 5'- GCG TGA GGC TCT GTG GTG AA-3' e M119: 5'- ATG ACG ACC GCT TGG GAG AC-3') (MARSH; WHITTINGTON; COUSINS, 1999); 4µL de



água Mili-Q ultrapura e 12,5µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega®) de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das reações foi realizado em um termociclador XP Thermal Cycler (Bioer Technology CO. LTD) com uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 37 ciclos a 94°C por 30 segundos para desnaturação, 64°C por 30 segundos para o anelamento e 72°C por 1 minuto para a extensão, com um ciclo final de 72°C por 10 minutos (KAUR et al., 2010). Então, a análise com enzimas de restrição foi realizada utilizando as enzimas HinfI e MseI como descrito por Kaur et al. (2010) e Sevilla et al. (2005). Os genótipos foram então identificados pelos padrões de migração dos fragmentos descritos por Marsh et al. (1999), como observados na tabela 2. A identificação da filogenia de MAP foi realizada de acordo com Stevenson (2015).

**Tabela 1:** Tamanhos de bandas esperadas logo após a digestão pelas enzimas de restrição (HinfI e MseI) do produto de PCR da região IS1311.

Produto da PCR	Identificação da cepa	Tamanho da banda (pb)
IS1311	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (Sheep)	285, 323
	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (Cattle)	67, 218, 285, 323
	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (Bison)	67, 218, 323
	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	134, 189, 285

Marsh et al. (1999)

### 3.6. Sequenciamento das amostras para validação da PCR IS1311

Para validar as amplificações, a amostra que foi positiva na PCR da região IS1311 do MAP foi encaminhada para o sequenciamento. A amostra foi purificada utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction Kit*® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciadas bidirecionalmente por protocolos padrão usando o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em um sequenciador automatizado ABI-PRISM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências foram analisadas utilizando-se a plataforma do *Basic Local Align Sequence Tool* (BLAST; [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)).

### 3.7. Comitê de Ética da Pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob a licença n° 123/2015.

## 4. Resultados

Das duas amostras de queijo tipo coalho de búfala analisadas, uma foi positiva no cultivo e confirmada na PCR da região IS900. A amostra positiva foi tipificada como pertencente ao tipo *Cattle*, subtipo *Bison*. O sequenciamento da região IS1311 da amostra positiva revelou similaridade de 99% com uma sequência depositada no BLAST pertencente ao MAP tipo *Cattle*, subtipo *Bison* (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolate bison insertion sequence IS1311, partial sequence).

## 5. Discussão

Dados sobre a paratuberculose em búfalos no Brasil são escassos e bem recentes; o primeiro relato dessa enfermidade acometendo essa espécie no país ocorreu no Estado de Pernambuco em um rebanho leiteiro (MOTA et al., 2010). Em seguida, outros relatos surgiram nos estados do Maranhão e Alagoas (REIS et al., 2015; BRITO et al., 2016).

Para os autores, este é o primeiro estudo que relata o isolamento de MAP em amostras de queijo tipo coalho de búfala no Brasil. Não foram encontradas pesquisas que relatam a presença de MAP em leite e/ou subprodutos da espécie bubalina. Porém, outros estudos realizados na região Nordeste identificaram o DNA de MAP em amostras de leite de vacas (ALBUQUERQUE et al., 2017), e também já foi relatado um isolado desse microrganismo em amostras de queijo tipo coalho de bovino no Estado do Piauí (FARIA et al., 2014).

Sung & Collins (2000) verificaram que a capacidade de sobrevivência de MAP em queijos pode variar de acordo com algumas características físico-químicas como a concentração de sal e pH, entretanto, os autores constataram que o fator que mais contribuiu para redução de MAP viável foi o tratamento térmico do leite assim como o tempo de maturação do queijo. Apesar do queijo de búfala desta pesquisa ter passado por tratamento térmico, ainda foi possível detectar o MAP no isolamento e PCR. Vale salientar que esse microrganismo é capaz de sobreviver a processos térmicos que simulam a pasteurização (SUNG; COLLINS, 1998). Isso, somado ao fato de o queijo tipo coalho geralmente não passar por nenhum processo de maturação pode favorecer sua sobrevivência no alimento (SUNG; COLLINS, 2000).

Existe a suspeita de que o MAP possa estar associado a algumas importantes enfermidades em humanos como a doença de Chron (GHADIALI et al., 2004; KHAN et al., 2016), a sarcoidose (BROWNELL et al., 2011), síndrome de Blau (DOW;

ELLINGSON, 2010), a esclerose múltipla (COSSU et al., 2011), tireoidite de Hashimoto (SISTO et al., 2010) e diabetes tipo 1 (RANI; SECHI; AHMED, 2010). A relação do consumo de alimentos de origem animal contaminados com MAP e o desenvolvimento da doença de Chron nos humanos ainda não está devidamente esclarecida (WADDELL et al., 2016). Ainda são necessárias pesquisas para abordar temas relacionados à exposição humana ao MAP para auxiliar a tomada de decisões com base em evidências sobre o potencial problema de saúde pública.

Este é o primeiro estudo que tipificou o MAP isolado de queijo de búfala no Brasil e só recentemente foi realizado no país a primeira tipificação molecular de MAP em amostras de leite caprino em Viçosa, MG, que também foi do tipo *Cattle* (SOUZA et al., 2016), mas não pertencente ao subtipo *Bison* identificada nesta pesquisa.

Até o momento, apenas cepas de MAP do tipo *Cattle* e *Cattle* subtipo *Bison* foram identificadas em amostras de fezes e biópsias provenientes de humanos com casos confirmados da doença de Chron ou suspeitos (SINGH et al., 2009; WADDELL et al., 2016). Estudos indicam, ainda, que embora a cepa tipo *Cattle* de MAP predomine entre os ruminantes (com exceção de ovinos) e não ruminantes, também há evidências crescentes sobre a importância do subtipo *Bison* e sua capacidade para infectar diferentes espécies hospedeiras (SINGH et al., 2009; SOHAL et al., 2014; AHLSTROM et al., 2015; PODDER et al., 2015).

## 6. Conclusão

Neste estudo foi possível confirmar a presença de MAP viável em amostra de queijo tipo coalho de búfala do tipo *Cattle*, subtipo *Bison*. Estes resultados podem auxiliar em estratégias de controle de MAP em alimentos, visto que esse microrganismo é suspeito de estar envolvido com enfermidades nos humanos.

## 7. Referências Bibliográficas

AHLSTROM, C.; BARKEMA, H. W.; STEVENSON, K.; ZADOKS, R. N.; BIEK, R.; KAO, R.; TREWBY, H.; HAUPSTEIN, D.; KELTON, D. F.; FECTEAU, G.; LABRECQUE, O.; KEEFE, G. P.; MCKENNA, S. L. B.; DE BUCK, J. Limitations of variable number of tandem repeat typing identified through whole genome sequencing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on a national and herd level. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2015.

ALBUQUERQUE, P. P. F. de; SANTOS, A. de S.; SOUZA NETO, O. L. de; KIM, P. de C. P.; CAVALCANTI, E. F. T. S. F.; OLIVEIRA, J. M. B. de; MOTA, R. A.; JÚNIOR, J. W. P. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk from the state of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 113–117, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.010>>.

BENEDICTUS, G.; DIJKHUIZEN, A. A.; STELWAGEN, J. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. **Veterinary Record**, v. 121, n. 7, p. 142–146, 1987. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3660545](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3660545)>.

BRITO, M. F.; DOS SANTOS BELO-REIS, A.; BARBOSA, J. D.; UBIALI, D. G.; DE CASTRO PIRES, A. P.; DE MEDEIROS, E. S.; DE MELO, R. P. B.; DE ALBUQUERQUE, P. P. F.; YAMASAKI, E.; MOTA, R. A. Paratuberculosis in buffaloes in Northeast Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 7, p. 1497–1501, 2016.

BROWNELL, I.; RAMÍREZ-VALLE, F.; SANCHEZ, M.; PRYSTOWSKY, S. Evidence for mycobacteria in sarcoidosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 45, n. 5, p. 899–905, 2011.

COSSU, D.; COCCO, E.; PACCAGNINI, D.; MASALA, S.; AHMED, N.; FRAU, J.; MARROSU, M. G.; SECHI, L. A. Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with multiple sclerosis in sardinian patients. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. 2–7, 2011.

DOW, C. T.; ELLINGSON, J. L. E. Detection of *Mycobacterium avium* ss. *Paratuberculosis* in Blau Syndrome Tissues. **Autoimmune Diseases**, v. 2010, p. 1–5, 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ad/2010/127692/>>.

FARIA, A. C. S.; SCHWARZ, D. G. G.; CARVALHO, I. A.; ROCHA, B. B.; DE CARVALHO CASTRO, K. N.; SILVA, M. R.; MOREIRA, M. A. S. Short communication: Viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail artisanal Coalho cheese from Northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4111–4114, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214003257>>.

GHADIALI, A. H.; STROTHER, M.; NASER, S. A.; MANNING, E. J. B. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains Isolated from Crohn's Disease Patients and Animal Species Exhibit Similar Polymorphic Locus Patterns. **Society**, v. 42, n. 11, p. 5345–5348, 2004.

KAUR, P.; FILIA, G.; SINGH, S. V.; PATIL, P. K.; SANDHU, K. S. Molecular detection and typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from milk samples of dairy animals. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n. 5, p. 1031–1035, 2010.

KHAN, I. A.; PILLI, S.; A, S.; RAMPAL, R.; CHAUHAN, S. K.; TIWARI, V.; MOULI, V. P.; KEDIA, S.; NAYAK, B.; DAS, P.; MAKHARIA, G. K.; AHUJA, V. Prevalence and Association of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with Disease Course in Patients with Ulcero-Constrictive Ileocolonic Disease. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152063, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27019109>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4809507>%5Cn<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4809507/>>.

MANNING, E. J. B. *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis*: a review of current knowledge. **Journal of Zoo and Wildlife medicine**, v. 32, p. 293–304, 2001.

MARSH, I.; WHITTINGTON, R.; COUSINS, D. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, n. 2, p. 115–126, 1999. Disponível em: <<papers3://publication/uuid/9C9D0064-000B-43AB-BCE7-86E82AFFB1B2>>.

MOTA, R. A.; PEIXOTO, P. V.; YAMASAKI, E. M.; DE MEDEIROS, E. S.; DA COSTA, M. M.; PEIXOTO, R. M.; BRITO, M. F. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 237–242, 2010.

OTT, S. L.; WELLS, S. J.; WAGNER, B. A. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, n. 3–4, p. 179–192, 1999.

PODDER, M. P.; BANFIELD, S. E.; KEEFE, G. P.; WHITNEY, H. G.; TAHLAN, K.

Typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from Newfoundland using fragment analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–11, 2015.

RANI, P. S.; SECHI, L. a; AHMED, N. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as a trigger of type-1 diabetes: destination Sardinia, or beyond? **Gut pathogens**, v. 2, p. 1, 2010.

REIS, A. S. B.; BRITO, M. F.; BEZERRA JÚNIOR, P. S.; FONSECA JÚNIOR, A. A.; UBIALI, D. G.; MOTA, R. A.; LEITE, R. C.; BARBOSA, J. D. Diagnóstico de paratuberculose por biópsia retal em búfalos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 10, p. 823–828, 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2015001000823&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2015001000823&lng=pt&tlng=pt)>.

SECHI, L. A.; DOW, C. T. *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* Zoonosis - The Hundred Year War - Beyond Crohn's Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAR, p. 1–8, 2015.

SEVILLA, I.; SINGH, S. V.; GARRIDO, J. M.; ADURIZ, G.; RODRÍGUEZ, S.; GEIJO, M. V.; WHITTINGTON, R. J.; SAUNDERS, V.; WHITLOCK, R. H.; JUSTE, R. A. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. **Revue Scientifique Et Technique**, v. 24, n. January 2006, 2005.

SINGH, S. V.; SOHAL, J. S.; SINGH, P. K.; SINGH, A. V. Genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates recovered from animals, commercial milk, and human beings in North India. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, 2009.

SISTO, M.; CUCCI, L.; D'AMORE, M.; DOW, T. C.; MITOLO, V.; LISI, S. Proposing a relationship between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and Hashimoto's thyroiditis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 42, n. 10, p. 787–790, 2010.

SOHAL, J. S.; ARSENAULT, J.; LABRECQUE, O.; FAIRBROTHER, J. H.; ROY, J. P.; FECTEAU, G.; L'HOMME, Y. Genetic structure of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* population in cattle herds in Quebec as revealed by using a combination of multilocus genomic analyses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52,

n. 8, p. 2764–2775, 2014.

SOUZA, M. C. C.; LIMA, M. C.; DE FREITAS ESPESCHIT BRAGA, I.; SCHWARZ, D. G. G.; DE SOUZA RODRIGUES, A. P.; SALES, E. B.; JUNIOR, A. A. F.; MOREIRA, M. A. S. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) isolated from dairy goats in Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 140, p. 18–21, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448816301201>>.

STEVENSON, K. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: A review. **Veterinary Research**, p. 1–13, 2015. Disponível em: <???.>.

SUNG, N.; COLLINS, M. T. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 999–1005, 1998.

SUNG, N.; COLLINS, M. T. Effect of Three Factors in Cheese Production (pH, Salt, and Heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1334–1339, 2000.

TADDEI, R.; BARBIERI, I.; PACCIARINI, M. L.; FALLACARA, F.; BELLETTI, G. L.; ARRIGONI, N. *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: Implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3–4, p. 338–347, 2008.

WADDELL, L. A.; RAJIĆ, A.; STÄRK, K. D. C.; MCEWEN, S. A. The potential Public Health Impact of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: Global Opinion Survey of Topic Specialists. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, n. 3, p. 212–222, 2016.

## 5. Considerações Finais

Os resultados deste estudo fortalecem os dados já existentes sobre a ocorrência de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em bovinos e bubalinos em várias regiões do Brasil. Ainda traz resultados inéditos ao indicar que a cepa tipo *Cattle* subtipo *Bison* de MAP é a única identificada no Brasil. Estes resultados darão suporte para as estratégias de controle da paratuberculose no país e outras pesquisas nesta área devem continuar para enriquecer os dados epidemiológicos sobre a enfermidade.

Registra-se a ocorrência do DNA de MAP em queijo tipo coalho na região nordeste do Brasil e também a ocorrência de MAP viável em queijo tipo coalho de búfala, sendo esta a primeira ocorrência registrada no país. É importante identificar os rebanhos e animais infectados nestas regiões para implementar medidas de controle da paratuberculose para assim reduzir o risco da exposição do consumidor de queijos de coalho bovino e bubalino.



## ANEXO 1

### Comitê de Ética



Universidade Federal Rural de Pernambuco

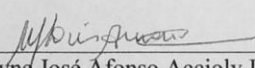
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,  
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

#### Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	123/2015
Número do processo	23082.022524/2015
Data de emissão da licença	09 de Novembro de 2015
Título do Projeto	Detecção e <i>genotipagem</i> do <i>Mycobacterium avium subsp</i> .paratuberculosis em amostras biológicas de bovinos e bubalinos e queijo coalho na região Nordeste do Brasil.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa.
Responsável pela execução do projeto	Rinaldo Aparecido Mota .
Colaboradores	José Wilton Pinheiro Júnior; André de Souza Santos; Júnior Mário Baltazar de Oliveira; Jonatas Campos de Almeida; Pedro Paulo Feitosa de Albuquerque .
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Bovino ; 100 (machos e fêmeas) ; Bubalino 100 (machos e fêmeas ) totalizando 200 animais. 50 Amostras de queijo coalho.

  
Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim  
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof. Dr. Marleyne Amorim  
Coordenadora CEUA