

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

LUENDA DE MENEZES E SÁ

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO *Mycobacterium*
avium subsp. *paratuberculosis* EM REBANHOS LEITEIROS DA
MICRORREGIÃO DE GARANHUNS – PERNAMBUCO, BRASIL**

GARANHUNS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE RUMINANTES

LUENDA DE MENEZES E SÁ

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO *Mycobacterium*
avium subsp. *paratuberculosis* EM REBANHOS LEITEIROS DA
MICRORREGIÃO DE GARANHUNS – PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientador: **Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior**

Co-orientador: **Prof. Dr. Daniel Friguglietti Brandespim**

GARANHUNS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE RUMINANTES

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO *Mycobacterium*
avium subsp. *paratuberculosis* EM REBANHOS LEITEIROS DA
MICRORREGIÃO DE GARANHUNS – PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação elaborada por:

LUENDA DE MENEZES E SÁ

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior
Presidente da Banca – Unidade Acadêmica de Garanhuns/ UFRPE

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi Costa

Prof. Dr. Daniel Friguglietti Brandespim

A meus pais, *Antônio* e *Amélia*, meu esposo *Salomão Novaes*, pelo incentivo, apoio e compreensão dispensados a mim sempre... E aos animais que estão sempre presentes na minha vida como parte indispensável...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco / Unidade Acadêmica de Garanhuns, pela oportunidade de participar e contribuir com o Programa de Pós-Graduação;

A Fundação de Amparo à Ciência e a Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE, pela concessão da bolsa de estudos modalidade mestrado, que com certeza foi de muita valia;

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro à execução do projeto;

Ao Professor José Wilton Pinheiro Júnior por apoiar, acreditar e com sabedoria coordenar a realização deste trabalho.

Aos Professores Daniel F. Brandespim e Gustavo Ferrer pelo companheirismo e ensinamentos delegados;

Aos proprietários das fazendas visitadas, pela valiosa colaboração na disponibilização de animais para a realização desta pesquisa;

A Júnior Mário e Gislaine Raquel, alunos da graduação e do Programa de Pós-graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes desta instituição por todo o apoio e colaboração durante esta pesquisa;

A Taciana Galba e família que aconchegantemente me acolheram em sua residência, todas as vezes que foi preciso;

E a todos que compartilham comigo este caminho...

RESUMO

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* EM REBANHOS LEITEIROS DA MICRORREGIÃO DE GARANHUNS – PERNAMBUCO, BRASIL.

A paratuberculose é uma enfermidade que pode causar um impacto negativo para a pecuária nacional. Nos bovinos apresenta-se sob a forma de diarreia crônica intratável que causa uma enterite granulomatosa, onde os animais tornam-se apáticos e emagrecem progressivamente, diminuindo ou até mesmo cessando a produção leiteira. É causada pelo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP), um pequeno bacilo álcool-ácido-resistente, considerado como um dos menores do gênero, extremamente resistente a diversos ambientes. Objetivou-se com esse trabalho realizar um inquérito epidemiológico da infecção pelo MAP em bovinos leiteiros da microrregião de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. Para esse estudo foram coletadas amostras sanguíneas de 408 animais, provenientes de 19 rebanhos localizados em 15 municípios da microrregião. O exame sorológico foi realizado por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto para detecção de anticorpos frente ao *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Em todas as propriedades, um questionário investigativo foi aplicado para análise dos fatores de risco, e as coordenadas geográficas coletadas através de um aparelho de GPS (Global Position System) para realização da distribuição espacial. A prevalência da infecção pelo MAP foi de 2,7% (11/408; I.C. 1,4 – 4,9). O número de focos foi 47,4% (9/19). Na análise de regressão logística foi identificado como fator de risco a taxa anual de nascimentos superior a 51 bezerros/ano (OR 3,8; I.C. 1,1 – 13,1). Concluiu-se que a infecção pelo MAP encontra-se distribuída entre os rebanhos bovinos leiteiros da microrregião estudada e que medidas de controle baseadas nos fatores de risco devem ser implementadas com o objetivo de reduzir o número de focos e conseqüentemente aumentar a produtividade dos rebanhos, minimizando assim os prejuízos causados pela enfermidade aos produtores.

Palavras-chave: Doença de Johne, fatores de risco, MAP.

ABSTRACT

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF INFECTION WITH *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* IN DAIRY HERDS OF MICROREGION GARANHUNS - PERNAMBUCO, BRAZIL.

Paratuberculosis is a disease that can cause a negative impact on national livestock. In cattle cause chronic intractable diarrhea and granulomatous enteritis, these animals become listless and lose weight gradually, decreasing or ceasing milk production. It is caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP), an alcohol-acid resistant bacilli, resistant to many environments. The objective of this study makes an epidemiological investigation of MAP infections in dairy cattle the microregion of Garanhuns, Pernambuco, Brazil. For this study blood samples were collected from 408 animals from 19 herds in 15 counties of the microregion. Serologic testing was performed by indirect enzyme immunoassay (ELISA) for antibodies against the MAP. A questionnaire was applied to all properties for analysis of risk factors, and collected geographical coordinates through a GPS (Global Position System) device to perform the spatial distribution. The prevalence of MAP infection was 2.7% (11/408, I.C. 1.4 – 4.9). The number of foci was 47.4% (9/19). In logistic regression analysis was identified as a risk factor the annual rate of births over 51 calves / year (O.R. 3.8; I.C. 1.1 – 13.1). In conclusion an MAP infection is spread among the cattle's herds of microregion Garanhuns, Pernambuco, Brazil, and control measures based on risk factors should be implemented to reduce the number of outbreaks and consequently increase the productivity of herds.

Keywords: Johne disease, risk factors, MAP.

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Relatos da infecção pelo MAP em diversos estados brasileiros, 1915 – 2012	14

LISTA DE FIGURAS

	Página	
Figura 1	Municípios estudados, prevalências e distribuição geográfica das propriedades negativas e positivas frente à infecção pelo MAP, na Microrregião Garanhuns, Pernambuco, Brasil, 2012	38
Figura 2	Vista aérea de todas as propriedades visitadas obtidas através das coordenadas geográficas (ênfase para aguadas coletivas na maioria delas). Microrregião Garanhuns, Pernambuco – Brasil, 2012	39-40

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Paratuberculose ou Doença de Johne	13
3.2 Agente etiológico	15
3.3 Epidemiologia	16
3.4 Sinais Clínicos	17
3.5 Achados macroscópicos e microscópicos	17
3.6 Diagnóstico	18
3.7 Tratamento e Profilaxia	19
3.8 Potencial zoonótico	20
4. REFERÊNCIAS	22
5. ARTIGO CIENTÍFICO	30
5.1. Artigo 1: Submetido a Pesquisa Veterinária Brasileira	30
6. APÊNDICE	39
7. ANEXOS	41
7.1. Instruções aos autores	41

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um efetivo bovino de 209,541 milhões de animais, se mantendo como o segundo maior rebanho comercial do mundo, ficando atrás somente dos Estados Unidos da América (EUA). Na região Nordeste encontram-se 28.762 milhões deste total e Pernambuco com 1,1% do efetivo total, possui 2.383 milhões cabeças (IBGE, 2010).

Na produção de leite o Brasil detém 5% da produção mundial, ficando em quinto lugar, estando somente atrás de potenciais mundiais como EUA, Índia, China e Rússia (FAO, 2009). Possui uma produção nacional de 30.715 bilhões de litros do produto por ano, sendo 2,9% desta no estado de Pernambuco (IBGE, 2010).

A paratuberculose ou doença de Johne é uma enfermidade infecto-contagiosa, causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), caracterizada por causar um processo inflamatório intestinal em ruminantes domésticos e selvagens, determinando redução na digestibilidade dos alimentos, com conseqüente queda na produção (LARANJA DA FONSECA et al., 1999). Esta enfermidade, nos bovinos, se caracteriza por diarreia crônica escura, fétida e refratária a tratamentos com antimicrobianos (DARCOSO-FILHO, 1960; PORTUGAL, 1978; DRIEMEIER et al., 1999; GOMES, 2002).

No Brasil, a paratuberculose foi descrita em alguns estados e o aparecimento de novos casos sugere que o agente etiológico esteja disseminado principalmente entre as raças leiteiras (MOTA et al., 2010). Esta doença é considerada como um dos principais problemas para a saúde dos ruminantes de todo o mundo e impõe significativas perdas econômicas para a indústria de laticínios (JANAGAMA et al., 2010). No EUA, maior produtor de leite do mundo, essas perdas chegam a \$200 milhões de dólares por ano (CHO et al., 2012).

Exemplos dessas perdas em rebanhos bovinos leiteiros vão desde o atraso de retorno ao cio, redução da capacidade de absorver nutrientes, com conseqüente diminuição progressiva do peso, diminuição da capacidade de fornecimento de nutrientes ao feto, queda e/ou até a parada total da produção de leite, o que leva a um menor peso dos bezerros a desmama (ELZO et al., 2009; YAMASAKI et al., 2010).

Alguns fatores contribuem para a ocorrência da doença nos rebanhos, tais como sistema de criação intensivo, estresse da lactação, transporte e parto; deficiências minerais

e nutricionais, assim como imunossupressão causada pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (DVB) e elevada carga parasitária (MERKAL et al., 1975).

Há algum tempo vem se debatendo o potencial zoonótico do MAP, uma vez que este já foi isolado em tecidos intestinais de pacientes humanos portadores da doença de Crohn (CARVALHO et al., 2009). A doença de Crohn é uma enfermidade intestinal crônica de humanos, inflamatória e granulomatosa, semelhante à paratuberculose bovina (RUBERY, 2002). O MAP está presente nos organismos de pacientes com doença de Crohn, colite ulcerativa e em pacientes sem doenças inflamatórias do intestino, no entanto, esferoplastos (formas de parede celular deficiente) do MAP só foram encontrados em pacientes com doença de Crohn (MENDOZA et al., 2010). Como o MAP encontra-se presente nas fezes da população em geral e não só em doentes de Crohn positivos, ele pode estar envolvido nesta enfermidade, devido a uma resposta imune deficiente (TUCI et al., 2011). O leite cru pode ser uma fonte de contaminação potencial para a transmissão do microorganismo aos seres humanos (CARVALHO et al., 2009).

A necessidade de pesquisas sobre a situação da infecção por MAP e os fatores que influenciam a sua ocorrência nos rebanhos, justifica a realização deste trabalho na microrregião de Garanhuns, estado de Pernambuco, uma vez que a mesma localiza-se na bacia leiteira do estado e não existem dados sobre a ocorrência da infecção pelo MAP em bovinos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Diagnosticar e contribuir com dados epidemiológicos sobre a infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em bovinos leiteiros na Microrregião de Garanhuns, estado de Pernambuco.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar um inquérito sorológico para determinar a prevalência da infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*;
- Identificar os fatores de riscos associados à infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*;
- Analisar a distribuição espacial da infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Paratuberculose ou Doença de Johne

A paratuberculose é uma enfermidade infecto-contagiosa caracterizada por enterite granulomatosa crônica que acomete principalmente bovinos, ovinos, caprinos e ruminantes silvestres, causada pelo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP), e se caracteriza por apresentar uma longa fase sub clínica, acarretando grandes perdas na produção (BENNETT et al., 2012).

A doença foi descrita pela primeira vez, em 1895, por Johne e Fronthingham como forma atípica da tuberculose em uma vaca, na Alemanha. Em 1910, o MAP foi isolado, pela primeira vez, por Twort e, mais tarde, relatada por Twort e Ingram (1912). Posteriormente, a doença foi reconhecida em diversos países, com a denominação de doença de Johne.

A paratuberculose é uma enfermidade de notificação obrigatória para a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), e é considerada como um importante problema para o comércio internacional de animais e seus subprodutos (OIE, 2008). Ocorre mundialmente e vem sendo descrita em todos os continentes, sendo relatada na Polônia com prevalência de 6,3% (SZTEYN; WISZNIEWSKA-LASZCZYCH, 2011); na Eslovênia com 0,59% (KÛSAR et al., 2011); Índia com 32,1% (SHARMA et al., 2008); Austrália com 65,7% de rebanhos bovinos positivos (HUCHZERMEYER et al., 1994), EUA com 40,4% de propriedades com pelo menos um bovino soropositivo (PILLARS et al., 2009) e na Argentina com uma prevalência 41,6% (PAOLICCHI et al., 2003)

No Brasil a ocorrência da enfermidade e/ou infecção já foi registrada em diversos estados, conforme disposição na Tabela 1.

Tabela 1- Relatos da infecção pelo MAP em diversos estados brasileiros, 1915 – 2012

Autor	Ano	Estado	Frequência	Método de Diagnóstico
Dupont	1915	RJ	-	Exame Clínico, anatomopatologia e microbiologia
Santos e Silva	1956	RJ	1 bovino	Exame clínico, anatomopatologia, histopatologia e Ziehl Neelsen
Darcoso-Filho et al.	1960	RJ	3 bovinos	Exames clínicos e Patológicos
Silva e Pizelli	1961	RJ	1 bovino	Anatomopatologia e Histopatologia
Portugal et al.	1978	SC	2 bovinos	Reação Intradérmica PPD e cultivo do microrganismo a partir de linfonodos mesentéricos
Ramos et al.	1986	RS	1 bovino	Exame Clínico, reação intradérmica PPD, histologia, baciloscopia e anatomopatologia.
Nakajima et al.	1991	MG	1 bovino	Exame clínico, anatomopatologia, Ziehl-Nielsen, histopatologia e cultura de fragmentos intestinais.
Laranja da Fonseca et al.	1999	SP	37,9%	ELISA
Driemeier et al.	1999	RS	25,0%	Exames clínicos, anatomopatologia, histopatologia e isolamento do agente.
Dias et al.	2002	PB	160 amostras	Cultura fecal
Gomes et al.	2002	RS	3,6%	Cultivo Fecal
			11,4%	IDGA
			50,0%	ELISA absorvido
			39,8%	ELISA não absorvido
Acypreste et al.	2005	GO	60,2%	ELISA
Silva	2005	PA	35,4%	ELISA
Mota et al.	2007	PE	32,3%	Isolamento, anatomopatologia e PCR
Carvalho et al.	2009	MG	3,6%	PCR do leite
Mota et al.	2009	PB	1 bovino	Ex. clínico, anatomopatologia, histopatologia, Ziehl- Neelsen e microbiologia
Costa et al.	2010	ES	11,4%	ELISA
Yamasaki	2010	RJ	40,0%	ELISA
Medeiros et al.	2012	PB	10,8%	ELISA

3.2. Agente Etiológico

O *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* é classificado como um membro da Ordem dos *Actinomycetales*, Família *Mycobacteriaceae*, do complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*, este complexo é composto por quatro espécies: *M. avium avium* e *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum* e *M. avium intracellulare* (LILEMBAUM et al., 2007a). Fenotipicamente, o MAP difere do *M. avium* e *M. silvaticum* por sua dependência a micobactina, e genotipicamente pela presença de 15 ou 20 cópias do elemento de inserção IS900 (BANNANTINE et al., 2002).

O MAP é descrito como um pequeno bacilo-álcool-resistente (BAAR), que aparece geralmente agrupado em diversos tecidos e nas fezes, e se encontra geralmente no interior de macrófagos e/ou células gigantes de Langerhans, o que o torna bastante resistente a vários ambientes (COLLINS, 1996). Esta bactéria é altamente resistente a diversas situações extremas de frio, calor e pH, fazendo com que o agente infeccioso permaneça por longos períodos no solo, fezes e água (KLANICOVA et al., 2012). Um exemplo da persistência do MAP nesses ambientes é a sua viabilidade infecciosa por até dois meses na cultura de fermentadores de usina de biogás (SLANA et al., 2011), e como por exemplo, no solo e nas fezes pode resistir por até 47 meses (HUNTLEY et al., 2005).

Apesar da sua elevada resistência no ambiente, este microorganismo é sensível a vários desinfetantes, radiação ultravioleta e calor (BANNANTINE et al., 2002). O MAP é destruído após dez minutos de imersão no formol a 5%, no cresol diluído a 1:32, no fenol diluído a 1:40 e no hipoclorito de sódio diluído em 1:50 (COLLINS, 1996). O fenol na presença de detergente melhora a sua absorção pelo MAP, conferindo-lhe maior poder de destruição da bactéria, sendo então o mais indicado para descontaminação fecal (LILEMBAUM et al., 2007a)

O MAP apresenta o crescimento mais fastidioso dentre todas as micobactérias, com período de incubação de 8 a 12 semanas dependente da fonte exógena de incubação (LILEMBAUM et al., 2007a). O metabolismo do ferro é fundamental para a sobrevivência *in vivo* e *in vitro* do MAP, podendo a deficiência desse elemento ser determinante na sua virulência (JANAGAMA et al., 2010).

Atualmente acredita-se que o MAP contém uma mistura de células vegetativas e uma estrutura desconhecida semelhante a um esporo, sugerindo que a esporulação pode ser um mecanismo pelo qual ele persiste viável no hospedeiro e/ou meio ambiente por longos

períodos (LAMONT et al., 2012), o que torna a contaminação ambiental uma das principais fontes de transmissão do agente em rebanhos leiteiros (SMITH et al., 2011).

Pistone et al., (2012) na Itália, sugeriram uma circulação do MAP entre os animais terrestres, aquáticos, e no ambiente, mesmo não podendo confirmar a presença da bactéria na água, a presença do DNA do MAP encontrado é um indicador da distribuição generalizada desta bactéria no ambiente.

3.3. Epidemiologia

A principal via de transmissão é a fecal-oral, os animais portadores eliminam as micobactérias nas fezes, contaminando os alimentos e a água que são posteriormente ingeridos por animais suscetíveis, principalmente os mais jovens, nos quais a ingestão de leite e colostro contaminado também são importantes modos de transmissão (LARSEN et al., 1975; RIEMANN; ABBAS, 1983).

A permanência de animais suscetíveis em locais sujos com fezes contendo o MAP e o contato destes com tetos, pasto e outros alimentos contaminados elevam o risco de transmissão do MAP em um rebanho (GOMES et al., 2002). Aproximadamente 1/3 dos animais jovens expostos ao bacilo estão cronicamente infectados, isso dependerá do número de bacilos ingeridos e dos mecanismos de defesa do hospedeiro (LILENBAUM et al., 2007a).

A probabilidade da transmissão intrauterina do MAP é de menor importância epidemiológica, mas pode ocorrer (ADASKA; WHITLOCK, 2012). Embora o MAP tenha sido detectado no sêmen e no aparelho reprodutor de touros, a transmissão pelo sêmen ainda não foi completamente elucidada, entretanto, é confirmado que touros infectados podem eliminar o MAP no sêmen (MUNSTER et al., 2012).

Alguns fatores de risco contribuem para a disseminação do agente nos rebanhos, tais como, densidade populacional, manejo de pastagens, sistema de criação, estresse da lactação, transporte, parto, deficiências minerais e nutricionais, assim como certos estados imunossupressores causados pelo BVD, elevadas cargas parasitárias (MERKAL et al., 1975), tamanho do rebanho (quanto menor o rebanho, menor a incidência da enfermidade), idade (WOODBINE et al., 2009) e fornecimento de colostro *in natura* (NIELSEN et al., 2008). O contato de bezerros com fezes de vacas adultas infectadas pelo MAP é

considerado como o fator de risco mais importante na transmissão do agente (DORE et al., 2012).

Segundo modelo desenvolvido por Collins e Morgan (1991), algumas variáveis foram determinadas para observar os fatores de risco associados ao curso da infecção nos rebanhos das quais se destacam: tamanho do rebanho; taxa anual de nascimento dentro do rebanho; taxa anual de reposições dentro do rebanho; número de vacas infectadas no momento zero; número de reposições de rebanhos comprado anualmente; risco de comprar uma novilha infectada e número de contatos anuais efetivos entre vaca e bezerro.

Aparentemente não existe predisposição racial para a paratuberculose, porém em comparação com vacas leiteiras criadas intensivamente, o gado de corte por geralmente locomover-se livremente por grandes áreas fica menos exposto a outros bovinos e suas fezes, apresentando então, menor ocorrência da doença (LILENBAUM et al., 2007a).

3.4. Sinais Clínicos

Os sinais típicos desta enfermidade nos bovinos são emagrecimento progressivo, redução na produção de leite e carne, diarreia crônica e refratária a tratamentos diversos, caquexia e morte (DARCOSO-FILHO et al., 1960, CHIODINI et al., 1984), além de edema submandibular, alopecia (COELHO et al., 2009), e fertilidade diminuída (SWEENEY, 1996).

A doença evolui em três etapas: na primeira, o animal está infectado, contudo não apresenta sinais clínicos nem elimina o microorganismo, pois nesta fase o MAP está se disseminando pelo organismo hospedeiro. Após algum tempo, o agente se localiza no intestino do animal, que ainda não apresenta sinais clínicos, mas que passa a eliminar o bacilo nas fezes, progressivamente, à medida que aumenta a sua concentração na mucosa intestinal e no lúmen. Nesta segunda fase, já começa a haver desequilíbrio da mucosa intestinal e o animal não consegue absorver nutrientes de forma efetiva. O terceiro estágio clínico e excretório caracterizam-se por diarreia crônica intratável (COCITO et al., 1994).

3.5. Achados macroscópicos e microscópicos

As principais alterações macroscópicas dos achados de necropsia da paratuberculose são o espessamento da parede do intestino delgado, principalmente nos 2/3

finais, podendo concentrar todo o intestino, o aspecto reticulado ou em forma de pregas transversais na serosa das alças intestinais semelhantes a circunvoluções cerebrais com aspecto hemorrágico, a hipertrofia de linfonodos e vasos mesentéricos, a mineralização da parede das artérias, calcificação da serosa do rúmen (SANTOS; SILVA, 1956; RAMOS et al., 1986; DRIEMEIER et al., 1999; MOTA et al., 2007; YAMASAKI et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012), além de congestão e edemaciação das válvulas íleo-cecais (RODRIGUES et al., 2012).

A submucosa do trato intestinal, tanto cranial quanto caudalmente à região ileocecal, encontram-se infiltradas por macrófagos, células epitelióides e algumas células gigantes que contém grande quantidade do MAP. Um aumento transversal permanente sob a mucosa intestinal provocado por inflamação granulomatosa dentro da lâmina própria e da submucosa é a lesão macroscópica clássica observada em bovinos (HIRSH; ZEE, 2003).

À microscopia pode-se verificar intensa infiltração de macrófagos associado a raras células epitelióides e gigantes dos tipos Langerhans na lâmina própria, na submucosa e no ápice das vilosidades (RODRIGUES et al., 2012); na coloração de Ziehl-Neelsen observam-se bacilos álcool-ácido-resistentes no citoplasma dessas células (MOTA et al., 2007).

3.6. Diagnóstico

O diagnóstico da paratuberculose pode ser realizado por meio dos achados clínico-epidemiológicos; identificação do agente, achados de necropsia e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); testes sorológicos que incluem Fixação do complemento (FC), Ensaio imunoenzimáticos (ELISA) e Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e por testes de imunidade mediada por células, Gamma interferon e Hipersensibilidade do tipo tardia por meio da tuberculinização com PPD (derivado de proteína purificada) aviária (OIE, 2008).

A cultura é o teste ouro padronizado pela OIE, apesar de suas limitações logísticas e de praticidade na detecção do MAP em rebanhos infectados (DOUARRE et al., 2010). Entretanto, em função da natureza fastidiosa do agente e de seu crescimento lento, o cultivo fecal constitui um procedimento demorado e oneroso (BURGELT; GINN 2000). Comumente são utilizados dois meios básicos para cultura em meio sólido do MAP, o meio Lowenstein-Jensen (LJ) e Herrold com gema de ovo (HEYM), ambos contendo micobactina (NIELSEN et al., 2004).

O exame direto de fezes ou de tecidos por meio do método de coloração de Ziehl-Neelsen permite a visualização dos bacilos, no entanto, a visualização simples, não pode diferenciar o MAP de outras micobactérias ambientais (COLLINS, 1996).

O teste diagnóstico com base na sequência de DNA específico do microorganismo permite a identificação rápida e segura desses bacilos de crescimento lento. O PCR tem sido utilizado para confirmar resultados de cultura positiva e para identificar o MAP nas fezes, leite e tecidos, pela identificação do elemento de inserção IS900 (LILENBAUM et al., 2007b). Em bubalinos o PCR mostrou-se mais sensível que a cultura fecal, na detecção subclínica da Doença de Johne (MOTA et. al., 2010).

O ELISA indireto possui alta sensibilidade e especificidade e tem a capacidade de identificar animais soropositivos ainda assintomáticos, facilitando o controle da infecção nos rebanhos (ROUSSEL et al., 2007, COSTA et al., 2010). A especificidade do ELISA absorvido é próxima a 100% (DEHKORDI et al., 2009).

Embora o ELISA comercial seja amplamente utilizado para o diagnóstico de paratuberculose em vários países, no Brasil e em outros países em desenvolvimento, eles ainda são considerados caros para sua utilização rotineira, além disso, esses *kits* são difíceis de conseguir devido às barreiras sanitárias de importação de produtos biológicos (LILENBAUM et al., 2007a). Covarrubias et al., (2012) no México, padronizaram e desenvolveram um ELISA com antígeno protoplasmático de uma cepa 3065 de MAP, obtido a partir de ovelhas, que demonstrou uma sensibilidade de 79,31% e especificidade de 82,25%, se mostrando como uma nova alternativa de menor custo para o diagnóstico da paratuberculose em bovinos.

Estudos do perfil proteômico da parede celular do MAP, pode também vir a ser uma nova estratégia de diagnóstico da paratuberculose (HE; DeBUCK, 2010). Métodos viáveis para a detecção rápida do MAP no leite vêm sendo estudados, e demonstraram que é mais sensível em se tratando de leite cru quando comparado ao método de cultura convencional do leite para o MAP (BOTSARIS et al., 2010).

3.7. Tratamento e Profilaxia

Diversos antimicrobianos são eficazes frente ao MAP *in vitro*, entretanto nenhum deles proporciona resultados eficientes no tratamento do animal doente. Isto pode ser devido, ao menos em parte, a localização intestinal das lesões e a multiplicação intracelular

do microorganismo. De todos os antimicrobianos testados a isoniazida, rifampicina e gentamicina são os mais eficazes tanto *in vitro* como *in vivo*, porém nenhum destes elimina totalmente o agente (COCITO et al., 1994).

Existem vacinas contra paratuberculose, porém contradições acerca de seu uso vêm sendo relatadas, devido à bacterina utilizada ser viva e atenuada, devendo ser aplicada somente no primeiro mês de vida, pois pode interferir posteriormente nos testes imunológicos dos programas de erradicação, na eliminação dos animais identificados como infectados, além de confundir a interpretação dos testes cutâneos para a tuberculose bovina (OIE, 2008). Esta inespecificidade causada pela vacina impossibilitou seu uso no Brasil, onde a ocorrência de tuberculose bovina é relativamente alta e a notificação e abate é obrigatório (LILENBAUM, 2000).

Mundialmente existem programas de controle da paratuberculose, embora ainda não existam no Brasil, estes se baseiam em procedimentos de gestão de rebanhos, tais como limpeza das instalações com desinfetantes específicos e separação dos bezerros dos adultos infectados (LILENBAUM et al., 2007b). A boa recepção de informações pelos produtores acerca da enfermidade e prejuízos por ela causados, deve ser utilizada como incentivo para a promoção de uma mudança de comportamento para melhoria na implementação de medidas eficazes de controle nas propriedades (BENNETT et al., 2012).

3.8. Potencial Zoonótico

Há alguns anos, discute-se sobre a provável associação da paratuberculose animal com a doença de Crohn em humanos, implicando em possíveis riscos à saúde da população, tendo em vista que o MAP é eliminado também pelo leite, e o consumo de leite cru contaminado pode vir a ser um fator de risco à saúde humana (HERMON-TAYLOR, 2001).

A doença de Crohn (DC) é uma grave doença inflamatória do trato gastrointestinal, que acomete predominantemente a parte inferior do intestino delgado (íleo) e intestino grosso (cólon), mas pode atingir qualquer área do trato gastrointestinal. Esta enfermidade habitualmente causa diarreia, cólica abdominal, febre, e às vezes, sangramento retal. Também pode ocorrer perda de apetite e perda de peso consequentemente (ABCD, 2006).

O MAP foi relatado em pacientes com doença de Crohn, colite ulcerativa e em pacientes sem doenças inflamatórias do intestino, no entanto, esferoplastos (formas de

parede celular deficiente) do MAP só foram encontrados em pacientes com doença de Crohn (MENDOZA et al., 2010).

4. REFERÊNCIAS

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

ADASKA, J. M.; WHITLOCK, R.H. Low rate of detected in utero transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a dairy herd with a low prevalence of Johne's disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, n.1, p.153-155, 2012.

ASSOCIAÇÃO DE COLITE ULCERATIVA E DOENÇA DE CROHN. **ABCD**. Disponível em: <www.abcd.org.br>. Acesso em 16 de novembro de 2006.

BANNANTINE, J.P. et al. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. **Journal Clinical Microbiology**, v.40, p.1303-1310, 2002.

BENNETT, R.; McCLEMENT, I.; McFARLANE, I. Modelling of Johne's disease control options in beef cattle a decision support approach. **Livestock Science**, v.146, p.149-159, 2012.

BOTSARIS, G. et al. Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.587-590, 2010.

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

CARVALHO, J. A. et al. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by polymerase chain reaction in bovine milk in Brazil. Short communication. **Journal Dairy Science**, v.92, n.11, p.5408-5410, 2009.

CHIODINI, R. J. et al. Ruminant paratuberculosis (Johne' s Disease): The Current Status and Future Prospects. **Cornell Veterinary**, v.74, p.218-262, 1984.

CHO J. et al. Economic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds. **Journal Dairy Science**, v.95, n.4, p.1855-1872, 2012.

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

COELHO, A. C. et al. Comparação de duas técnicas de isolamento do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em amostras de fezes de ovinos com suspeita clínica de paratuberculose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.5, p.415-420, 2009.

COLLINS, M. T. Diagnosis of paratuberculosis: Veterinary Clinics of North América. **Food Animal Practice**, v.12, n.2, p.357-371, 1996.

COLLINS, M. T.; MORGAN, I. R. Economic decision analysis model of a paratuberculosis test and cull program. **Journal of American Medical Association**, v.199, n.12, p.1724-1729, 1991.

COSTA, J. C. M. et al. 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.

COVARRUBIAS, A. G. M. et. al. Desarrollo de um ensayo inmunoenzimatico (ELISA) para El diagnóstico de paratuberculosis em bovinos. **Tecnica Pecuaria en México**, v.3, n.1, p.1-18, 2012.

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

DEHKORDI, A. J.; KARIMI, I.; KHOSRAVI, M. A comparison of ELISA and histopathology for the detection of paratuberculosis in dairy cattle. **Comparative Clinical Pathology**, v.18, n.4, p 413-417, 2009.

DIAS, L. D. et al. Isolamento do *Mycobacterium paratuberculosis* a partir de fezes de bovinos suspeitos de Paratuberculose. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 24, 2002, Gramado. **Anais...** Gramado, SBMV, 2002. Meio digital (CD).

DORE, E. et al. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: A systematic review. **Journal Veterinary Intern Medicine**, v.26, p.32-45, 2012.

DOUARRE, P. E. et al. Isolation and detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. **Gut Pathogens**, v.27, n.2, p.172-174, 2010.

DUPONT, O. 1915. Nota do **Jornal do Commercio**, de 5 de novembro p.8, 1915.

DRIEMEIER, D. et al. Aspectos clínicos e patológicos da Paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, n.3/4, p.109-115, 1999.

ELZO, M.A. et al. Association between cow reproduction and calf growth traits and ELISA scores for paratuberculosis in a multibreed herd of beef cattle. **Tropical Animal Health Production**, v.41, n.6, p.851-858, 2009.

FAO - **ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO**, 2009. Disponível em: [_<https://www.fao.org.br/publicacoes.asp>](https://www.fao.org.br/publicacoes.asp). Acesso em 02 de julho de 2011.

GOMES. M. J. P. Aspectos Epidemiológicos da paratuberculose bovina no Rio Grande do Sul. **Tese** (doutorado) Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRRJ) 139p. 2002

HE, Z.; De BUCK, J. Localization of proteins in the cell wall of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K10 by proteomic analysis. **Proteome science**, v.8, n.21, p.1-9. 2010.

HERMON-TAYLOR, J. Protagonist. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is a cause of Crohn's diseases. **Gut Pathogens**, v.49, p.755-756, 2001.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003, 446p.

HUCHZERMEYER, H. F. A. K. et al. Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa. **Cape Town Oxford University Press**, v.2, c.173, p.1445-1457, 1994.

HUNTLEY, J. F. et al. Expression library immunization confers protection against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. **Infection and Immunity**, v.73, p.6877-6884, 2005.

IBGE – **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/default.shtm>, Acesso em 21 de março de 2012.

JANAGAMA, H. K. et al. Iron-sparing Response of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. **BMC Microbiology**, v.1, p.268, 2010.

JOHNE, H. A.; FRONTHINGHAM, L. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. **Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und Vergleichende Pathologie**, v.21, p.438-454, 1895.

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

KÜSAR, D. et al. Seroprevalence of cattle paratuberculosis in Slovenia in 2008 and a comparison of data from current and previous studies. **Slovenia Veterinary Research**, v.48, n.2, p.39-44, 2011.

LAMONT, E. A. et al. Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures. **PLoS ONE**, v.7, n.1, e30648, 2012.

LARANJA DA FONSECA, L. F. et al. Identificação da presença de anticorpos contra *M. paratuberculosis* em rebanhos leiteiros do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.66, p.122, 1999.

LARSEN, A. B.; MERKAL, R. S.; CUTLIP, R. C. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. **American Journal Veterinary Research**, v.36, p.255-257, 1975.

LILENBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina. Uma mini-revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.22, n.4, p.169-171, 2000.

LILENBAUM, W., MARASSI, C.D., OELEMANN, W.M.R. Paratuberculose: an update. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 580-590, 2007a.

LILENBAUM, W. et al. Interference of Tuberculosis on the performance of ELISAs used in the diagnosis of paratuberculosis in cattle. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.472-477, 2007b.

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

MENDONZA, J. L. et al. High prevalence of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's disease. **World Journal Gastroenterology**, v.16, n.36, p.4558-4563, 2010.

MERKAL, R. S. et al. Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis. **American Journal Veterinary Research**, v.36, n.6, p.837-838, 1975.

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

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

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

MÜNSTER, P. et al. 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** (resumo), [artigo no prelo] 2012.

NAKAJIMA, M. et al. Diagnóstico da Paratuberculose em Minas Gerais. In: Simpósio Brasileiro em Micobactérias,4. **Anais...**, Bauru, SP. [resumo 67] 1991.

NIELSEN S. S.; KOLMOS, B.; CHRISTOFFERSEN, A. B. Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n.1, p.149–153, 2004.

NIELSEN, S. S.; BJERR, 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.

OIE – WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH; Paratuberculosis (Johne`s disease). In: **OIE Terrestrial Manual**, c.2.1.11, p.276-291, 2008.

PAOLICCHI F.A. et al. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. **Journal Veterinary Medicine**, v.50, n.1, p. 20-26, 2003.

PISTONE, D. et al. *Mycobacterium avium paratuberculosis* in Italy: Commensal or emerging human pathogen? **Digestive and liver disease**, v.44, p.461-465, 2012.

PILLARS R.B., GROOMS D.L., WOLTANSKI J.A., BLAIR E. Prevalence of Michingan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as determined by environmental sampling. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 89, p.191-196, 2009.

PORTUGAL, M. A. S. C. et al. Ocorrência de Paratuberculose no estado de Santa Catarina. **O Biológico**, v.4, n.1/2, p.19-24, 1978.

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

RIEMANN, H. P.; ABBAS, B. Diagnosis and control of bovine paratuberculosis (Johne's disease). **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, n.27, p.481-506, 1983.

RODRIGUES, A. B. F. et al. Anatomopathology of paratuberculosis in dairy cattle from Resende – RJ. **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.2, p.228-233, 2012.

ROUSSEL, A. J. et al. Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.230, p.890-895, 2007.

RUBERY, E. A review of the Evidence for a Link between Exposure to *Mycobacterium paratuberculosis* (MAP) and Crohn's disease (CD) in Humans. **Food Standards Agency**, 2002. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/mapcrohnreport.pdf>>. Acesso em: 10 de outubro de 2010.

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

SHARMA, G. et al. Evaluation of indigenous Milk ELISA with m-culture and PCR for the diagnosis of bovine Johne's diseases (BTD) in lactating Indian dairy cattle. **Research in Veterinary Science**, v.84, n.1, p.30-37, 2008.

SLANA, L. et al. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at a farm-scale biogas plant supplied with manure from paratuberculosis-affected dairy cattle. **American Society for Microbiology**, v.77, n.9, p.3115-3119, 2011.

SMITH, R. L. et al. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.102, n.1, p.1-9, 2011.

SILVA, E. B. Diagnóstico da Paratuberculose em bovinos de corte do estado do Pará, Brasil. 2005. 65f. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, 2005.

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

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

SZTEYN, J.; WISZNIEWSKA-LASZCZYCH, A. Seroprevalence of bovine paratuberculosis infections in Poland. **Medycyna weterynaryjna**, v.67, n.9, p.622-625, 2011.

TUCI, A. et al. Fecal detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* using the IS900 DNA sequence in Crohn's disease and ulcerative colitis patients and healthy subjects. **Dgi Dis Sci, [on line]** 2011. Disponível em: <<http://www.bioportfolio.com/news/article/617535/Fecal-Detection-Of-Mycobacterium-Avium-Paratuberculosis-Using-The-Is900-Dna-Sequence-In.htm>>. Acesso em: 25 de julho de 2011.

TWORT, F. W.; INGRAM, G. Z. Y. A method for isolating and cultivating *Mycobacterium enteritidis, chronicae, pseudotuberculosis, bovis, johne*, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccina for pseudotuberculosis enteritis of bovines. **Proceedings of the Royal Society of London – Series B: Biological Sciences**, v.84, p.517-543, 1912.

WOODBINE, K. A. et al. Seroprevalence and epidemiological characteristics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on 114 cattle farms in south west England. **Preventive Veterinary Medicine**, v.89, n.1-2, p.102-109, 2009.

YAMASAKI, E. M. Aspectos clínicos-patológicos da Paratuberculose em rebanho bovino leiteiro no município de Rio Claro, RJ. 2010. 80f. **Dissertação** (Mestrado), UFRJ. Rio de Janeiro, 2010.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

5.1. Artigo 1 – Submetido a Revista Pesquisa Veterinária.

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* EM REBANHOS LEITEIROS DA MICRORREGIÃO DE GARANHUNS – PERNAMBUCO, BRASIL

Aspectos epidemiológicos da infecção pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em rebanhos leiteiros da Microrregião de Garanhuns – Pernambuco, Brasil¹

Luenda de Menezes e Sá, José Wilton Pinheiro Júnior.

ABSTRACT.- Sá, L. M. & Pinheiro Júnior J.W. 2012. [Epidemiological aspects of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds of Microregion Garanhuns -Pernambuco, Brazil] Aspectos epidemiológicos da infecção pelo *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* em rebanhos leiteiros da Microrregião Garanhuns – Pernambuco, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Av. Bom Pastor s/n, Boa Vista, Garanhuns, PE 55296-901, Brazil. E-mail: jrwilton@uag.ufrpe.br.

The objective of this study conduct an epidemiological survey of MAP infection in dairy cattle of the region of Garanhuns, Pernambuco, Brazil. For this study blood samples were collected from 408 animals from 19 herds in 15 countries of the microrregion. All the properties, an investigative questionnaire was applied to analysis of risk factors, and coordinates collected via a GPS (Global Position System) device. The prevalence of MAP infection was 2,7% (11/408, I.C. 1,4 – 4,9). The number of outbreaks was 47,4% (9/19). In logistic regression analysis was identified as a risk factor the annual rate of births over 51 calves/year (OR 3.8, CI 1.1 - 13.1). Concluding that MAP infection is widespread among dairy cattle in the microrregion studied. And as for the control of infection should be considered a risk factor evidenced in this study and protective factors, and in followed correctly can be used as preventive measures to minimize the spread of the agent in cattle.

INDEX TERMS: Johne diseases, risk factor, MAP.

RESUMO.- Objetivou-se com esse trabalho realizar um inquérito epidemiológico da infecção pelo MAP em bovinos leiteiros da microrregião de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. Para este estudo foram coletadas amostras sanguíneas de 408 animais, provenientes de 19 rebanhos localizados em 15 municípios. O exame sorológico foi realizado por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto para detecção de anticorpos frente ao *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Em todas as propriedades, foi aplicado um questionário investigativo para análise dos fatores de risco, e as coordenadas geográficas coletadas através de um aparelho de GPS (Global Position System) para realização da distribuição espacial. A prevalência da infecção por MAP foi de 2,7% (11/408; I.C. 1,4 – 4,9). O número de focos foi 47,4% (9/19). Na análise de regressão logística foi identificado como fator de risco a taxa anual de nascimentos superior a 51 bezerros/ano (OR 3,8; I.C. 1,1 – 13,1). Desta forma, conclui-se que a infecção pelo MAP encontra-se presente nos rebanhos bovinos leiteiros da microrregião estudada e que medidas de controle baseadas nos fatores de risco identificados devem ser implementadas com o objetivo de reduzir o número de focos da infecção.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doença de Johne, fatores de risco, MAP.

¹ Recebido em...

Aceito para publicação em

INTRODUÇÃO

A paratuberculose é uma enfermidade caracterizada por enterite granulomatosa crônica que acomete principalmente bovinos, ovinos, caprinos e ruminantes silvestres, sendo causada pelo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP), e se caracteriza por apresentar uma longa fase sub clínica, ocasionando grandes perdas na produção (Bennett et al. 2012). É um dos principais problemas para a saúde dos ruminantes de todo mundo e causa significativas perdas econômicas para a indústria de laticínios (Janagama et al. 2010). No maior produtor de leite, EUA, essas perdas chegam a \$200 milhões de dólares por ano (Cho et al. 2012).

No Brasil relatos de paratuberculose em bovinos ocorreram no Rio de Janeiro (Dupont 1915, Santos & Silva 1956, Darcoso-Filho et al. 1960, Silva & Pizelli 1961, Yamasaki et al. 2010), Santa Catarina (Portugal et al. 1979), Rio Grande do Sul (Ramos et al. 1986, Driemeier et al. 1999), Minas Gerais (Nakajima et al. 1991), São Paulo (Laranja da Fonseca et al. 1999), Paraíba (Dias et al. 2002, Mota et al. 2009, Oliveira et al. 2010, Medeiros et al. 2012), Goiás (Acypreste et al. 2005), Pará (Silva 2005), Espírito Santo (Costa et al. 2010) e Pernambuco (Mota et al. 2007).

Alguns fatores contribuem para a ocorrência da doença nos rebanhos, tais como, sistema de criação, tamanho do rebanho, nível de produção, manejo do rebanho (especialmente criação de animais jovens com adultos), estresse da lactação, transporte, parto, deficiências minerais e nutricionais e elevadas cargas parasitárias (Merkal 1975, Dufour et al. 2004). O contato direto de bezerros com fezes de vacas adultas infectadas pelo MAP, foi considerado por Doré et al. (2012), como o fator de risco mais importante na transmissão do agente aos bezerros.

Com a análise epidemiológica da infecção pelo MAP, espera-se subsidiar a elaboração de medidas profiláticas integradas, contribuindo significativamente para redução das perdas decorrentes da paratuberculose em bovinos leiteiros, visto que há poucos dados da mesma. Objetivou-se com esse trabalho relatar os aspectos epidemiológicos da infecção por MAP em bovinos leiteiros da microrregião de Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco com a licença nº 014/2010.

Os animais foram procedentes de rebanhos leiteiros de 15 municípios da Microrregião de Garanhuns, estado de Pernambuco. Foram analisados animais de 19 propriedades distribuídas nos municípios de Angelim (1), Bom Conselho (2), Caetés (1), Calçados (1), Canhotinho (1), Correntes (1), Garanhuns (2), Iati (2), Jucati (1), Lagoa do Ouro (1), Lajedo (1), Palmeirina (1), Saloá (2), São João (1) e Terezinha (1).

Para compor a amostra de estudo da prevalência admitiu-se uma prevalência esperada de 50%, visto que não há dados da ocorrência da infecção na microrregião estudada. Essa proporção maximizou o tamanho da amostra com intervalo de confiança de 95% e erro estatístico de 5% (Astudillo 1979). Esse parâmetro forneceu um tamanho de amostra (n) de 385 animais (Thrusfield 2004). Para o cálculo das amostras por propriedade utilizou-se o programa computacional WinEpiscope 2.0, utilizando-se os parâmetros de amostragem supracitados. Como margem de segurança foram coletadas 408 amostras de bovinos de raças variadas, acima de dois anos de idade, com aptidão leiteira e submetidos a diferentes sistemas de manejo.

Antes de cada coleta foi aplicado em cada um dos rebanhos visitados, um questionário investigativo, padronizado, contendo questões sobre o manejo higiênico-sanitário do rebanho, além de anotações individuais por animal quando necessário.

O exame sorológico foi realizado de acordo com o protocolo preconizado pelo Kit para detecção de anticorpos frente ao MAP (Pourquier ® ELISA - IDEXX). Para o cálculo dos

resultados, as reações consideradas válidas foram a média do controle positivo (CPx), quando este apresentou um valor mínimo médio de OD450 de 0,350 e quando o coeficiente entre a média do CPx e o controle negativo (CN A450) foi igual ou superior a 3,00. As amostras com percentagens M/P inferior a 60% foram consideradas negativas, amostras com resultado superior a 60% e menos que 70% inconclusivas e maiores ou iguais a 70%, positivas a presença de anticorpos frente ao MAP.

Foi utilizada a análise estatística descritiva para o cálculo das frequências relativa e absoluta dos resultados obtidos no teste sorológico. Para identificar os fatores de risco associados à infecção, foi realizada uma análise univariada das variáveis de interesse através do teste qui-quadrado de Pearson, ou Exato de Fisher, quando necessário. Posteriormente foi feita uma análise de regressão logística, considerando como variável dependente o exame sorológico (positivo ou negativo). O programa *EPI INFO™, versão 7.1.0.6.*, foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos.

Para elaboração dos mapas de distribuição geográfica das propriedades (positivas e negativas) foram coletadas coordenadas na projeção *Universal Transversal Mercator (UTM)* em cada propriedade visitada com o auxílio de um equipamento GPS (*Global Position System*). Os dados georreferenciados foram lançados nos aplicativos *TerraView* para o mapeamento cartográfico.

RESULTADOS

A prevalência da infecção por MAP foi 2,7% (11/408; I.C. 1,4 – 4,9). O número de focos foi 47,4% (9/19), e pertenciam aos municípios de Caetés (1), Saloá (1), Garanhuns (2), Lajedo (1), Canhotinho (1), Palmeirina (1) e Bom Conselho (2). Dos nove focos (Fig 1), o que apresentou maior prevalência foi Bom Conselho com animais positivos nas duas propriedades visitadas (5,0% e 11,7%), seguido por Saloá (10,0%), Caetés e Palmeirina (6,6%).

Na análise univariada dos fatores de risco observou-se associação significativa para a taxa anual de nascimentos ($p=0,0390$). Outras variáveis analisadas, porém, sem associação significativa ao nível 5%, foram: sistema de criação ($p=0,8812$), fonte hídrica ($p=0,7238$), tipo de ordenha ($p=0,3251$), limpeza das instalações ($p=0,7082$), presença de bezerro ao pé ($p=0,7666$), animais para reposição provenientes da propriedade ($p=0,8722$), quarentena ($p=0,6030$), manejo reprodutivo ($p=0,6367$), desinfecção dos instrumentos de rotina ($p=0,8888$), rotação de pastagens ($p=0,4199$), suplementação alimentar ($p=0,4521$), esterqueira ($p=0,1957$), comedouros comuns para jovens e adultos ($p=0,2480$), contaminação dos alimentos com fezes ($p=0,1364$), limpeza do úbere antes do fornecimento do colostro ($p=0,8623$), contato dos bezerros com fezes de adultos ($p=0,8413$) e piquete maternidade ($p=0,5260$).

O resultado da análise de regressão logística dos fatores de risco associados ao MAP, confirmou como fator de risco com associação positiva, a taxa anual de nascimentos superior a 51 bezerros por ano (OR 3,8; IC 1,1 – 13,1).

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo da infecção por MAP na microrregião estudada. A prevalência da infecção por MAP em rebanhos bovinos leiteiros da microrregião de Garanhuns (2,7%) se mostrou inferior a alguns estudos realizados em outras regiões brasileiras, como São Paulo com 37,9% (Laranja da Fonseca et al. 1999), Pernambuco, 32,3% (Mota et al. 2007), Rio de Janeiro com 40% (Yamasaki et al. 2010) e Espírito Santo 11,4% (Costa et al. 2010). Estudos recentes realizados em outros países estimaram prevalências semelhantes, como Eslovênia com 3,9% (Küsar et al. 2011), Polônia 6,3% (Szteyn & Wiszniewska-Laszczych 2011) e Iran com prevalências variando de 4,2% a 7,7% (Sadati et al. 2012).

A diferença dos resultados deste estudo em relação ao registrado nos demais estados brasileiros pode ser devido ao método de diagnóstico, protocolo e fabricante dos diferentes *kits* ELISA, ao tipo de delineamento amostral, ou ao tipo de manejo sanitário adotado nos diferentes rebanhos. Silva (2005) ao realizar um estudo, no estado do Pará, com um *kit* ELISA da Suécia, com ponto de corte inferior ao deste trabalho encontrou resultado superior (35,4%). Yamasaki et al. (2010) e Mota et al. (2007) trabalharam com propriedades com suspeita clínica ou histórico da enfermidade, o que pode ter contribuído para as elevadas prevalências registradas.

Mesmo com a baixa prevalência, o número de focos (47,4%) foi elevado (Fig.1), como em trabalho apresentado por Acypreste et al. (2005) que encontraram 100,0% de focos em Goiânia, Brasil. O elevado número de focos pode estar relacionado à reposição de animais sem o devido controle sanitário, pois observou-se que 100,0% das propriedades realizavam reposição de até 50 animais/ano sendo 88,8% destes provenientes do próprio rebanho. Desta forma, acredita-se que a não identificação de animais positivos pode contribuir para este quadro, uma vez que o animal, na maioria dos casos, se infecta quando bezerro e permanece dentro do rebanho eliminando o agente e contaminando o ambiente, sendo considerado como portador inaparente. A infecção dos bezerros portadores inaparentes pode ser um fator para a manutenção do agente no rebanho (Sweeney et al. 2006).

Observou-se, também, em 88,8% das propriedades consideradas como foco, que a água fornecida era parada (açudes e/ou barreiros), o que pode contribuir para o elevado número de focos, uma vez que o MAP pode permanecer viável no solo, nas fezes e na água por longos períodos, e essa água pode servir como fonte de transmissão para os animais do rebanho e rebanhos vizinhos que porventura utilizem essa água para consumo dos animais.

Em relação ao manejo de criação observaram-se animais positivos nos três tipos de criação (extensivo, intensivo e semi-intensivo), não havendo, porém, associação significativa. A presença da infecção nestes três tipos de criação indica que independente do sistema, casos de infecção por MAP podem acontecer, portanto a ocorrência está mais relacionada ao manejo higiênico sanitário inadequado, não realização de quarentena e exame sorológicos ao adquirir e introduzir animais nas propriedades. Mundialmente existem programas de controle da paratuberculose, embora ainda não existam no Brasil, estes se baseiam em procedimentos de gestão de rebanhos, tais como limpeza das instalações com desinfetantes específicos (formol 5%, cresol, fenol e hipoclorito de sódio), e na separação dos bezerros dos bovinos adultos infectados (Lilenbaum et al. 2007).

Na análise de regressão logística identificou-se como fator de risco associado à infecção por MAP, a taxa anual de nascimentos superior a 51 bezerros por ano, que apresentou 3,8 vezes mais chances de infecção, quando comparados a rebanhos com taxas menores de nascimento. Este fato pode estar relacionado ao tamanho do rebanho, pois em rebanhos maiores há ausência de piquete maternidade e os bezerros menores de seis semanas tinham contato direto com fezes de animais adultos infectados e isto pode contribuir para a disseminação do agente, visto que a transmissão do MAP ocorre principalmente em pastos contaminados ou úberes sujos com fezes contaminadas. Associado a este fato, o tamanho e a densidade populacional podem contribuir para um maior número de casos (Dufour et al. 2004). Esse fator de risco também foi identificado por Collins e Morgan (1991) que desenvolveram um modelo de infecção, onde discorreram sobre alguns fatores de risco que podem ser avaliados para o acompanhamento do curso da infecção em um rebanho, como o tamanho do rebanho, a taxa anual de nascimentos dentro do rebanho, taxa anual de reposição dentro do rebanho, vacas infectadas, compra de novilhas infectadas e o contato efetivo entre vacas e bezerros. Teoria também confirmada por Hirst et al. (2004), que destacaram a taxa anual de nascimentos e reposição como importantes fatores de risco associados à infecção.

O contato dos adultos e principalmente dos bezerros com pastagens contaminadas, aumentam a suscetibilidade destes perante a infecção pelo MAP, já que um dos fatores de risco mais importantes na transmissão do agente é o contato de bezerros com fezes de

animais adultos infectados (Dore et al. 2012). A infecção pela via oral dos animais que fazem uso de pastagens adubadas naturalmente com esterco contaminado, ou que ingerem o leite de vacas que tenham úberes sujos com fezes dos currais e pastos, foram associados significativamente com o estado da infecção no rebanho, e relatados por Riemann & Abbas (1983), Collins e Morgan (1991), Ansari-Lari et al.(2009) e Twari et al. (2009).

Outros fatores que indicaram uma tendência associada à infecção pelo MAP, embora sem associação significativa, foram a não realização de quarentena ao comprar animais para reposição (OR 1,7; p=0,6067), ordenha manual (OR 1,8; p=0,3315), presença de bezerro ao pé (OR 1,2; p=0,7670) e a falta de higienização das instalações (OR 1,4; p=0,7098). Desta forma, sugere-se que ao adquirir animais e introduzi-los nos rebanhos os proprietários devem realizar uma quarentena com o intuito de impedir a introdução de animais infectados pelo MAP, assim como a de outros agentes infecciosos, tudo isso, deve ser associado ao correto manejo higiênico-sanitário das instalações e a rigorosa manutenção dos equipamentos de ordenha. Esses fatores já haviam sido confirmados anteriormente como fatores de risco em estudo realizado por Ferreira (2004), Goodger et al. (1996) e Tavornpanich et al. (2008), que concluíram também que a ordenha deve ser feita da forma mais higiênica e menos demorada possível e que pela implantação de melhoria nas práticas de manejo higiênico sanitário dos rebanhos, a prevalência da infecção pelo MAP pode ser diminuída.

A distribuição de informações e/ou orientação aos produtores sobre a enfermidade e prejuízos por ela causados, deve ser utilizada como incentivo para a promoção de uma mudança de comportamento para melhoria na implementação de medidas eficazes de controle nas propriedades (Bennett et al. 2012).

CONCLUSÃO

Concluiu-se que a infecção pelo MAP ocorre nos rebanhos bovinos leiteiros da microrregião de Garanhuns, Pernambuco, Brasil, o que indica a necessidade da implantação de medidas sanitárias de controle e campanhas de promoção em saúde para que a enfermidade não atinja maiores prevalências, diminuindo assim o número de focos nesta região que representa uma das principais bacias leiteiras do estado.

Agradecimentos – À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de mestrado do primeiro autor. E ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto com número do processo: 473629/2009-7.

REFERÊNCIAS

- Acypreste C.S., Juliano R.S., Riveira F.E.B., Silva L.A.F., Fioravanti M.C.S. & Dias-Filho F.C. 2005. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação. Ciên. Ani. Bras. 6(1):55-59.
- Ansari-Lari, M., Haghkhah M., Bahramv A. & Baberan A.M.N. 2009. Risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Fars province (Southern Iran) dairy herds. Trop. Ani. Heal. Prod. 41:553-557.
- Astudillo V.M. 1979. Encuestas por muestro para estudios epidemiológicos em poblaciones animales. Organización Panamericana de La Salud – Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro.
- Bennett R., McClement I. & McFarlane I. 2012. Modelling of Johne's disease control options in beef cattle: a decision support approach. Livestock Science. 146: 149-159.
- Cho J., Taver L.W., Schukken. Y.H., Gomez M.I., Smith R.L., Lu Z. & Grohn Y. T. 2012. Economic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds. Jour. Dai. Sci. 95(04):1855-1872.

- Collins M.T. & Morgan I.R. 1991. Economic decision analysis model of a paratuberculosis test and cull program. *J. Ame. Med. Assoc.* 199(12):1724-1729.
- Costa J.C.M., Pieri F.A., Souza C.F., Espeschit I.F., Felipe A.G., Santos G.M., Tobia F.L., Silva-Junior A. & Moreira M.A.S. 2010. Levantamento sorológico de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62(6):1491-1494.
- Dacorso-Filho P., Campos I.O.N., Faria J.F. & Langenegger J. 1960. Doença de Johne (paratuberculose) em bovinos nacionais. *Arq. Inst. Biol. Ani.* 3:129-139.
- Dias L.D., Lobato P.M.P.C., Lage A.P., Assis R.A. & Santos T.M. 2002. Isolamento do *Mycobacterium paratuberculosis* a partir de fezes de bovinos suspeitos de Paratuberculose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29. Anais... Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária.
- Doré E., Paré J., Côté G., Buczinski S., Labrecque O., Roy J.P. & Fecteau G. 2012. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: A systematic review. *J. Vet. Int. Med.* 26:32-45.
- Dufour, B., Pouillot, R. Durand, B. A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds. *Veterinary research.* v.35, p. 69-81, 2004.
- Dupont O. 1915. Nota do Jornal do Comercio de 5 de novembro p. 8, 1915.
- Driemeier D., Cruz C.E.F., Gomes M.J.P., Corbellini G., Loretto A.P. & Colodel E.M. 1999. Aspectos clínicos e patológicos da Paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Agro. Bras.* 19(3/4):109-115.
- Ferreira, L. C. B. Leite orgânico. Caderno Técnico Emater. Ed. 1. Brasília - DF, 2004.
- Gomes M.J.P. 2002. Paratuberculose bovina: um grande desafio sanitário brasileiro. Matéria técnica. *Revista Minas Leite.*
- Goodger W.J., Collins M.T., Nordlund K.V., Eisele C., Pelletier J., Thomas C.B. & Sockett D.C. 1996. Epidemiologic study of on farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. *J. Ame. Vet. Med. Assoc.* 208(11):1877-1880.
- Hirst H.L., Gary F.B., Morley P.S., Salman M.D., Dinsmore R., Wagner B.A., McSweeney K.D. & Goodell G.M. 2004. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection among dirty cows in Colorado and herd -level risk factors for seropositivity. *J. Ame. Vet. Med. Assoc.* 225(1):97-101.
- Janagama H. K., Lamont E.A., George S., Bannantine J.P., Xu W.W., Tu Z.J., Wells S.J., Schefers J. & Sreevatsan S. 2010. Iron-sparing Response of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. *BMC Microbiology.*1: 268.
- Küsar D., Oecephik M., Logar K., Pate M. & Krt B. 2011. Seroprevalence of cattle paratuberculosis in Slovenia in 2008 and a comparison of data from current and previous studies. *Slov. Vet. Res.* 48(2):39-44.
- Laranja da Fonseca L. F., Santos M.V., Pereira C.C., Olival A.A., Heinemann M.B., & Richtzenhain L.J. 1999. Identificação da presença de anticorpos contra *M. paratuberculosis* em rebanhos leiteiros do estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.* 66:122.
- Lilenbaum W., Marassi C.D. & Oelemann W.M.R. 2007. Paratuberculosis: an update. *Bras. Jour. Microb.* 38:580-590.
- Medeiros J. M. A., Garino - Junior F., Matos R. A. T., Costa V. M. M. & Riet-Correia F. 2012. Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semi-árido paraibano. *Pesq. Vet. Bras.* 32(8):697-700.
- Merkal R.S. 1975. Analysis of the effects of inaparent bovine paratuberculosis. *Amer. J. Vet. Res.* 36(6):837-838.
- Mota, P. M. P. C., Pires P.S., Assis R.A., Salvarani F.M., Leite R.M.H., Dias L.D., Leite R.C., Lobato F.C.F., Guedes R.M.C. & Lage A.P. 2009. Paratuberculosis in a dairy Gyr herd in the State of Paraíba, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 29(9):703-706.

- Mota R.A., Pinheiro-Jr J.W., Gomes M.J.P., Peixoto R.M., Maia F.C.L., Brito M.F., Chies J.A.B., Snel G.G.M., Bercht B.S. & Juffo G.D. 2007. Paratuberculose em um rebanho bovino leiteiro no Estado de Pernambuco, PE. *Arq. Inst. Biol.* 74(2):73-79.
- Nakajima M., Maia F.C.L. & Mota P.M.P.C. 1991. Diagnóstico da Paratuberculose em Minas Gerais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO EM MICOBACTÉRIAS, 4. Anais...Bauru, SP:[resumo 67].
- Oliveira D.M., Riet-Correa F., Galiza G.J.N., Assis A.C.O., Dantas A.F.M., Bandarra P.M. & Garino-Jr F. 2010. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*[online].30(1):67-72.
- Portugal M.A.S.C., Pimentel J.N., Saliba A.M., Baldassi L. & Sandoval E.F.D. 1979. Ocorrência de Paratuberculose no estado de Santa Catarina. *O Biológico.* 4(1/2):19-24.
- Ramos E.T., Poester F.P., Correa B.L., Oliveira S.J., Rodrigues N.C. & Cabarro C.E. 1986. Paratuberculose em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Hora Vet.* 6(34):28-32.
- Riemann H.P. & Abbas B. 1983. Diagnosis and control of bovine paratuberculosis (Johne's disease). *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 27:481-506.
- Sadati R., Jafarpour M., Mirinargesi M., Nazemi A. & Barghi A. 2012. Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle bred in northern Iran by nested - PCR. *Global Vet.* 8(3):259-263.
- Santos J.A. & Silva N.L. 1956. Sobre a Primeira observação da Paratuberculose no Brasil. *Boletim da SBMV.* 24:5-14.
- Silva E. B. 2005. Diagnóstico da Paratuberculose em bovinos de corte do estado do Pará, Brasil. Dissertação (Mestrado), núcleo de estudos em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Centro de ciências agrárias, 65p.
- Silva N.M. & Pizelli G.N. 1961. Estudos sobre a Paratuberculose I. Diagnóstico de um caso da doença. *Arq. Inst. Biol. Ani.* 4:169-173.
- Sweeney R.W., Uzonna J., Whitlock R.H., Habecker P.L., Chilton P. & Scott P. 2006. Tissues predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Pesq. Vet. Sci.* 80:253-259.
- Sztejn J. & Wiszniewska-Laszczuch. A. 2011. Seroprevalence of bovine paratuberculosis infections in Poland. *Med. Wet.* 67(9):622-625.
- Tavornpanich S., Johnson W.O., Anderson R.J. & Gardner I.A. 2008. Herds characteristics and management practices associated with seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy herds. *Ame. J. Vet. Res.* 69(7):904-911.
- Thrusfield M. V. 2004. *Epidemiologia Veterinária.* 2ª ed. São Paulo.
- Twari A., Vanlleuwen J.A., Dohoo I.R., Keefe G.P., Haddad J.P., Scott H.M. & Whiting T. 2009. Risk of factors associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* seropositivity in Canadian dairy cows and herds. *Prev. Vet. Med.* 88(1):32-41.
- 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. 2010. Aspectos clínicos-patológicos e controle da Paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. *Pesq. Vet. Bras.* 30(11):921-932.

Legendas

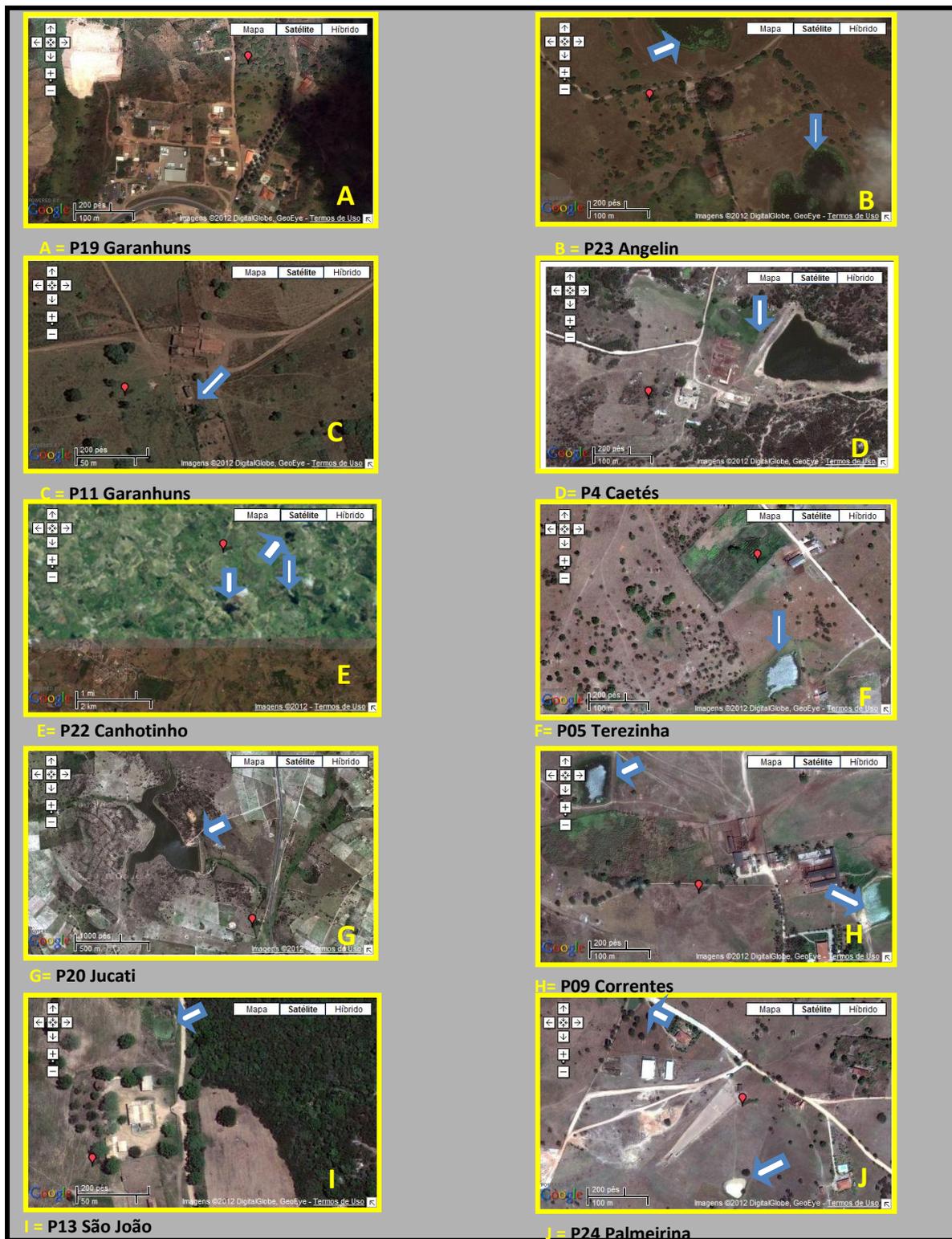
Fig.1. Municípios estudados, prevalências e distribuição geográfica das propriedades negativas e positivas frente à infecção pelo MAP, na Microrregião Garanhuns, Pernambuco, Brasil, 2012



Figura 1

6. APÊNDICE

Figura 2. Vista aérea de todas as propriedades visitadas obtidas através das coordenadas geográficas (ênfase para aguadas coletivas na maioria delas). Microrregião Garanhuns, Pernambuco – Brasil, 2012





K = P21 Lajedo



L = P14 Saloá



M = P08 Lago do Ouro



N = P18 Bom Conselho



O = P16 Iati



P = P10 Saloá



Q = P15 Iati



R = P12 Bom Conselho



S = P17 Calçados

Legenda



Propriedades



Aguas (Açudes, barreiros ou córregos)

7. ANEXOS

7.1. Instruções aos autores

(REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA)

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

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação. Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 120,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

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

- a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.
- b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet- Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;
- c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;
- d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;
- e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;
- f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;
- g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;
- h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;
- i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;
- j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

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

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas: a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS).

As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

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

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

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

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto- e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

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

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

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

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

LICENÇA Nº.
014/2010
07/2/2010

46



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



SOLICITAÇÃO DE LICENÇA PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

1. IDENTIFICAÇÃO DO SOLICITANTE

NOME	José Wilton Pinheiro Junior
INSTITUIÇÃO DE ORIGEM	Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco
CARGO/FUNÇÃO	Prof. Adjunto I de Doenças Infecciosas (Bacterioses e Virozes dos Animais Domésticos)
DEPARTAMENTO/UNIDADE ACADÊMICA	Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco
ENDEREÇO ELETRÔNICO E TELEFONE	jrwilton@uag.ufrpe.br

2. DADOS DA EQUIPE

RESPONSÁVEL (IS)	NOME FUNÇÃO	FORMAÇÃO/QUALIFICAÇÃO*
	Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior, Professor Adjunto I da disciplina de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Coordenador do Projeto	
COLABORADOR (ES)	NOME FUNÇÃO	FORMAÇÃO/QUALIFICAÇÃO ¹
	Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota, PhD, Pós Doutor em Parasitologia Veterinária, professor associado II de Bacterioses dos Animais Domésticos e Doenças Infecciosas da Reprodução de Ruminantes, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).	
	Prof. Dr. Daniel Friguglietti Brandespim, Prof. Adjunto, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE.	
	Profª. Dra. Andréa Alice da Fonseca Oliveira, Doutora em Patologia Animal e professora adjunto de Patologia Animal no Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE.	
	Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva, Professor Adjunto, Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE.	
	Prof. Dr. Mateus MatiuZZi da Costa, Prof. Adjunto, Universidade do Vale do São Francisco.	

CEUA - UFRPE
Aprovado em
13/10/2010
Validade
13/10/2012

	<p>Prof. Msc. Rodolfo de Moraes Peixoto, Instituto Federal de Floresta.</p> <p>Antônio Fernando Barbosa Batista Filho, Acadêmico de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Garanhuns.</p> <p>Laiano José Tenório Vaz Diniz, Acadêmico de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Garanhuns.</p>
--	---

3. DADOS GERAIS DO PROJETO

TÍTULO	Diagnóstico da Paratuberculose e Análise de Risco em Rebanhos Bovinos Leiteiros na Microrregião Garanhuns do Estado de Pernambuco
ÁREA TEMÁTICA ¹	Medicina Veterinária Preventiva
FINANCIAMENTO	CNPq/Edital Unversal MCT/CNPq 14/2009 Processo nº 473629/2009-7
DATA INICIO/TÉRMINO	Novembro 2009/Novembro 2011
LOCAL DE EXECUÇÃO	Universidade Federal Rural de Pernambuco

De acordo com o CNPq



4. RESUMO DO PROJETO

O aparecimento de enfermidades nos rebanhos bovinos, além de prejuízos econômicos e de agravos à saúde pública, determinam problemas sociais por dúvidas no mecanismo de transmissão e suas conseqüências. Pequenos e médios produtores perdem animais de seus rebanhos, fonte de renda, o que gera complicações como desemprego e a migração descontrolada para os grandes centros e, dependendo da enfermidade, embargos econômicos ao país. Objetiva-se com este projeto diagnosticar e realizar estudo epidemiológico sobre a paratuberculose em bovinos leiteiros em propriedades rurais da Microrregião Garanhuns do estado de Pernambuco. Os animais serão procedentes de rebanhos localizados nos municípios de Angelim, Bom Conselho, Brejão, Caetés, Calçado, Canhotinho, Correntes, Garanhuns, Iati, Jucati, Jupi, Jurema, Lagoa do Ouro, Lajedo, Palmerina, Paranatama, Saloá, São João e Teresinha. Para compor a amostra do estudo da prevalência será considerado um total de 336.221 cabeças (IBGE, 2007) e uma prevalência esperada de 50%, visto que não há dados sobre a ocorrência desta infecção na microrregião Garanhuns do estado de Pernambuco. Essa proporção maximizará o tamanho da amostra, garantindo a confiança mínima de 95% e erro estatístico de 5%. Este parâmetro fornece um tamanho da amostra (n) a ser examinado de 385 bovinos leiteiros. Serão obtidas amostras de soro sanguíneo e fezes para realização de exame sorológico e microbiológico associado à Reação em Cadeia da Polimerase, respectivamente. A proposta apresentada neste projeto fundamenta-se na necessidade de conhecimento da situação da enfermidade na microrregião Garanhuns do estado de Pernambuco, visto que não há dados da mesma, e sua participação direta ou indireta na queda de produtividade nos rebanhos bovinos. O estudo de análise de risco possibilitará caracterizar a presença do agente, avaliar os fatores para sua difusão ambiental e estimar o risco de exposição de pessoas e animais, até mesmo de outras espécies susceptíveis, a enfermidade, além de subsidiar a elaboração de medidas profiláticas integradas, que contribuirão significativamente para redução nas possíveis perdas decorrentes da paratuberculose em bovinos leiteiros.



5. JUSTIFICATIVA PARA A REALIZAÇÃO DO PROJETO (DESTACAR A RELEVÂNCIA DO PROJETO E CONTRIBUIÇÃO PARA O AVANÇO DO CONHECIMENTO ATUAL E/OU POTENCIAIS BENEFÍCIOS PARA A ESPÉCIE SOB ESTUDO E/OU ESPÉCIE HUMANA)

O projeto de pesquisa é inédito na região em estudo e será executado por profissionais qualificados na área. A partir das informações obtidas espera-se determinar a real participação do agente nos rebanhos analisados, assim como obter informações epidemiológicas que deverão nortear as principais medidas sanitárias e de biossegurança que devem ser implementadas nas propriedades da região, e poderão ser extrapoladas para propriedades de bovinos leiteiros em todo o Estado. Outro ponto a ser destacado é a publicação dos resultados analisados em periódicos nacionais e internacionais com fator de impacto elevado fornecendo subsídios para outros pesquisadores nacionais e médicos veterinários relacionados com a saúde e produção animal ressaltando a importância da enfermidade. Do ponto de vista social espera-se com este projeto reduzir as perdas econômicas na bovinocultura de leite ocasionada pela enfermidade, o que aumentará a produtividade para o produtor rural, além de contribuir de forma decisiva para melhoria da condição social para os atores envolvidos diretamente nesta cadeia produtiva, estimulando a forma correta de como lidar com esta enfermidade, para que a mesma não ocasione graves perdas econômicas e riscos à Saúde Pública. Outro ponto a ser destacado é a captação de novos recursos e investimentos para pesquisa na cadeia produtiva da bovinocultura de leite, setor este que é uma das principais fontes de renda da microrregião em estudo.



6. INFORMAÇÕES SOBRE O (S) ANIMAL (IS) SUJEITO À EXPERIMENTAÇÃO

ESPÉCIE/NOME VULGAR	Bovina
IDADE	Acima de dois anos de idade
SEXO	Fêmea
ORIGEM ¹	Propriedades de bovinos leiteiros da microrregião Garanhuns

¹Em caso de animal silvestre, anexar comprovante de licença do IBAMA, especificando método de captura, manipulação e soltura. Para as espécies domésticas, de produção ou companhia, anexar modelo de carta de consentimento do proprietário.

7. INFORMAÇÕES SOBRE O DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

TIPO DE DELINEAMENTO	Para compor a amostra do estudo da prevalência será considerado um total de 336.221 cabeças (IBGE, 2007) e uma prevalência esperada de 50%, visto que não há dados sobre a ocorrência desta infecção na microrregião Garanhuns do estado de Pernambuco. Essa proporção maximizará o tamanho da amostra, garantindo a confiança mínima de 95% e erro estatístico de 5%.
NÚMERO DE ANIMAIS	<p>POR GRUPO TOTAL</p> <p>O tamanho da amostra (n) a ser examinado de 385 bovinos leiteiros. O número de animais avaliados em cada rebanho será calculado pela fórmula:</p> $n = \frac{n'}{1 + (n+N)}$ <p>Onde: n = número de animais a serem testados no rebanho N = número estimado de animais em cada rebanho Fonte: (ASTUDILLO, 1979).</p>

8. INFORMAÇÕES SOBRE MANEJO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

TIPO E TAMANHO DA INSTALAÇÃO (GAIOLA, BAIÁ, TANQUE, ETC.)	Não se aplica
DENSIDADE POPULACIONAL POR ÁREA/VOLUME	Não se aplica
CLIMATIZAÇÃO (CASO SE APLIQUE)	Não se aplica
RENOVAÇÃO DO AR/ÁGUA (CASO SE APLIQUE)	Não se aplica



ALIMENTAÇÃO (TIPO, QUANTIDADE E FREQUÊNCIA)	Não se aplica
ÁGUA (QUANTIDADE E FREQUÊNCIA)	Não se aplica
HIGIENIZAÇÃO (TÉCNICA E FREQUÊNCIA)	Não se aplica
COLETA E DESTINO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS E LÍQUIDOS	Não se aplica
OUTRAS INFORMAÇÕES	Não se aplica



9. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL (PREENCHER UM QUADRO PARA CADA TIPO)

NOME DO PROCEDIMENTO	Coleta de amostras fecais e sanguíneas
REQUER INDUÇÃO DE PATOLOGIA OU LESÃO?	Não se aplica
GRAU DE SEVERIDADE ¹	Não se aplica
PROVOCA, INTENCIONALMENTE, ESTRESSE NO (S) ANIMAL (IS)?	Não se aplica
PROVOCA, INTENCIONALMENTE, DOR NO (S) ANIMAL (IS)?	Não se aplica
O (S) ANIMAL (IS) SERÁ (ÃO) IMOBILIZADO (S)? ESPECIFICAR (TIPO E TÉCNICA)	Não se aplica
SERÁ REALIZADO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO? ESPECIFICAR (TIPO, TÉCNICA E FREQUÊNCIA)	Não se aplica
USARÁ SEDAÇÃO/ANALGESIA/ANESTESIA? ESPECIFICAR (DROGA, DOSAGEM, VIA E FREQUÊNCIA)	Não se aplica
QUAL O LOCAL ONDE SERÁ REALIZADO O PROCEDIMENTO CIRÚRGICO?	Não se aplica
INDIQUE O MÉDICO VETERINÁRIO RESPONSÁVEL ² , INCLUSIVE CRMV, CASO SE APLIQUE	Não se aplica
USARÁ PROTOCOLO DE PREVENÇÃO DE DOR NO PÓS-CIRÚRGICO? ESPECIFICAR (DROGA, DOSAGEM, VIA E FREQUÊNCIA)	Não se aplica
SERÁ REALIZADA EXPOSIÇÃO, INOCULAÇÃO ³ OU ADMINISTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIA? ESPECIFICAR (TIPO, DOSAGEM, VIA E FREQUÊNCIA)	Não se aplica
SERÁ REALIZADA EXTRAÇÃO DE FLUIDOS/TECIDOS? ESPECIFICAR (TIPO, MÉTODO DE COLHEITA, QUANTIDADE E FREQUÊNCIA)	<p>Soro sanguíneo</p> <p>Serão obtidos através de venopunção da jugular, aproximadamente 10mL de sangue, para os exames sorológicos, sendo armazenados em tubos de ensaio, identificados e encaminhados ao Laboratório de Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.</p> <p>Fezes</p> <p>As amostras serão coletadas diretamente do reto, em sacos plásticos apropriados, individualmente de cada animal do rebanho, onde posteriormente serão agrupadas obtendo-se um "pool" de amostras de fezes de cada propriedade. As mesmas serão posteriormente acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, refrigeradas a 4^o C e encaminhadas para análise microbiológica no Laboratório de Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.</p> <p>Fragmento de órgãos</p> <p>Os animais considerados positivos no isolamento bacteriano cujo proprietário permita a eutanásia serão necropsiados para obtenção de fragmentos de intestino delgado, intestino grosso, linfonodos mesentéricos, fígado, baço, rim, pulmão.</p>
SERÁ REALIZADA EUTANÁSIA ⁴ /ABATE ⁵ DURANTE O EXPERIMENTO? ESPECIFICAR (NÚMERO DE ANIMAIS, TÉCNICA, DROGA, DOSAGEM, ETC)	Os animais considerados positivos no isolamento bacteriano cujo proprietário permita



a eutanásia serão necropsiados. O protocolo será: Maleato de acepromazina na dose de 0,1mg/kg para tranquilizar o animal;

Como anestésico geral será utilizado Éter glicérol guaicol (EGG) a 10% em soro isotônico associado ao tiopental sódico.
EGG – 100 mg/Kg; Tiopental sódico 10 mg/Kg.

Cloreto de Potássio 19,1% na dose de 0,8mL/Kg 9

¹Para classificação considerar o Guia de Preenchimento do protocolo CEUA-Fiocruz, disponível no link CEUA-UFRPE

²De acordo com a Lei 5.517 de 23 de outubro de 1968, Art. 5º, alínea "a".

³Em caso de inóculo infeccioso, indicar a classe de risco

⁴Considerar a Resolução n° 714 de junho de 2002 do CFMV (atualizada em 2008).

⁵Considerar técnica recomendada pela legislação vigente, de acordo com a espécie (MAPA Instrução Normativa N° 3, de 17 de janeiro de 2000)

10. JUSTIFICATIVA PARA O ENVOLVIMENTO DE ESTRESSE E/OU DOR INTENCIONAL NO (S) ANIMAL (IS) EXPERIMENTAL (IS) - CASO SE APLIQUE

Não se aplica



11. INFORMAÇÕES SOBRE O DESTINO DO (S) ANIMAL (IS) VIVO (S) OU MORTO (S), APÓS O TÉRMINO DO EXPERIMENTO¹

Os animais que forem eutanasiados serão enterrados na propriedade, para tal procedimento será aberta uma vala no solo, colocando uma camada de cal de 10 cm, onde o animal morto será depositado. O mesmo será coberto com camada de cal, e em seguida será acrescentado inicialmente, terra que esteve em contato com o animal, e posteriormente, será realizado o fechamento, com a terra que foi retirada ao se abrir à vala. Por último, será adicionada nova camada de cal, na superfície do solo.

¹Inclusive reutilização do (s) animal (is). Neste caso, justificar.

12. INFORMAÇÕES SOBRE AS CONDIÇÕES DE BIOSSEGURIDADE E IMPACTO AMBIENTAL OFERECIDOS PELO EXPERIMENTO – CASO SE APLIQUE

Não se aplica

13. TERMO DE RESPONSABILIDADE:

Certifico que este projeto não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe responsável/colaboradora é treinada para executar os procedimentos descritos nesse protocolo, estando todos cientes dos Princípios Éticos na Experimentação Animal constantes na legislação vigente e no Regimento Interno da CEUA-UFRPE e concordo plenamente com as suas exigências durante a execução desse experimento.

NOME: José Wilton Pinheiro Junior

DATA: 13/10/2010

ASSINATURA: *José Wilton Pinheiro*

ASSINATURA DO MÉDICO VETERINÁRIO RESPONSÁVEL (CASO SE APLIQUE): *José Wilton Pinheiro*

CRMV: 3247-76



CEUA - UFRPE
Aprovado em
13/10/2010
Validade
13/10/2012