

MARINA DE CASTRO CAMPOS DE SOUZA

**CAPRINOCULTURA LEITEIRA COMERCIAL NA REGIÃO DA ZONA DA
MATA DE MINAS GERAIS: ORGANIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E
OCORRÊNCIA DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S729c
2015 Souza, Marina de Castro Campos de, 1989-
Caprinocultura leiteira comercial na região da Zona da
Mata de Minas Gerais : organização da produção e
ocorrência de *Mycobacterium avium* subsp. (Map) / Marina
de Castro Campos de Souza. - Viçosa, MG, 2015.
xi, 70f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.58-70.

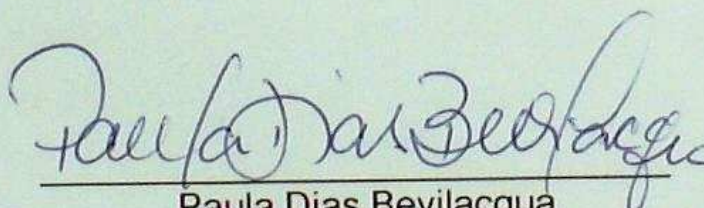
1. Caprino - Doenças. 2. *Paratuberculose*.
3. *Mycobacterium avium*. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós em
Medicina Veterinária. II. Título.

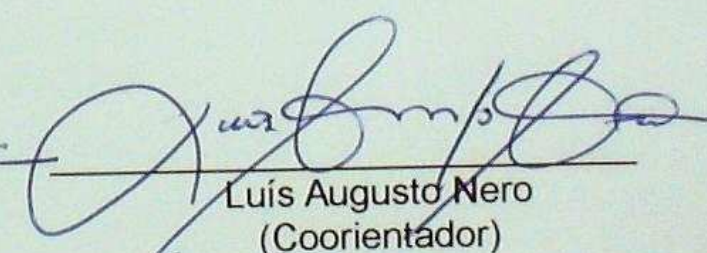
CDD 22. ed. 636.3089

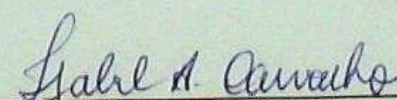
**CAPRINOCULTURA LEITEIRA COMERCIAL NA REGIÃO DA ZONA DA
MATA DE MINAS GERAIS: ORGANIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E
OCORRÊNCIA DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map)**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de junho de 2015.


Paula Dias Bevilacqua
(Coorientadora)


Luís Augusto Nero
(Coorientador)


Isabel Azevedo Carvalho


Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Orientadora)

***“ E até lá, vamos viver
Temos muito ainda por fazer
Não olhe pra trás
Apenas começamos
O mundo começa agora
Apenas começamos “***

Metal Contra As Nuvens – Legião Urbana

Agradecimentos

A Deus, por me abençoar e orientar diariamente nas minhas escolhas e por me dar saúde para cumprir com meus objetivos;

À Universidade Federal de Viçosa, parte do meu sonho, por apoiar os projetos de pesquisa e, desse modo, formar profissionais capacitados ao mercado de trabalho;

Aos meus pais, por estarem sempre presentes, alegrando-se com meu sucesso e me apoiando nas dificuldades;

A minha irmã, companheira, amiga, cúmplice de tudo: Ivy, por nunca sair do meu lado e fazer tudo para nossa família;

Ao meu padrinho, por me acompanhar em tudo e me amar incondicionalmente;

À Lolly, minha neném, por ter sido e ainda ser meu grande motivo para voltar pra casa;

À Professora Cida, por ter sido, além de orientadora, uma amiga, e por entender minhas limitações, estando sempre de portas abertas para me ouvir;

À Professora Paula, pelos desafios, ensinamentos e amizade;

Ao Professor Nero, pelo apoio técnico e profissional;

Ao Professor Marcelo, por apoiar e facilitar a execução desse trabalho;

Ao Antônio e ao LBM, pela orientação e por realizar as análises desse experimento;

A Isabel, por sempre tirar minhas dúvidas e por aceitar participar da banca;

Aos colegas do Ldbac, Virologia e Lipoa, pela convivência e troca de experiências;

À Ju, grande amiga desde sempre, pelos incentivos e puxões de orelha;

À Magna e ao Wederson, dois amigos que o mestrado me deu, e que vou levar para a minha vida;

A todos os funcionários do SMVPSP, especialmente ao Luiz Carlos, pela alegria contagiante e por fazerem de tudo para me ajudar. Luiz, agora você já pode aposentar!;

Aos produtores de leite de cabra da Zona da Mata de Minas Gerais, por abrirem suas casas e permitirem a execução desse trabalho;

Aos animais, cuja existência move o meu amor pela profissão;

Aos motoristas da UFV, pelo bom humor, paciência e disposição;

Aos estagiários: Johanna, Carolina, Jéssica, Pedro, Stefany, Maristela, Geórggio: muito obrigada por acordarem de madrugada, por ficarem até muito tarde no laboratório, sempre dispostos a aprender e me ajudar;

Ao CNPq pela bolsa e financiamento deste trabalho;

A todos que, de alguma forma, possibilitaram a execução e o sucesso desse projeto.

SUMÁRIO

Lista de quadros e tabelas	vi
Lista de figuras	vii
Lista de siglas e abreviaturas	ix
Resumo	x
<i>Abstract</i>	xi
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1 A caprinocultura no Brasil e no mundo	3
2.2 A Zona da Mata do Estado de Minas Gerais	8
2.3 Paratuberculose em pequenos ruminantes	10
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4. Material e métodos	22
4.1 Seleção das propriedades e dos animais	22
4.2 Caracterização das propriedades	22
4.3 Coleta de amostras	23
4.4 Análise microbiológica	23
4.5 Análise molecular	25
5. Resultados e Discussão	29
5.1 Análise descritiva das propriedades	30
5.2 Detecção de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	44
6. Conclusões	51
7. Anexos	52
8. Referências bibliográficas	58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Principais países produtores de leite de cabra e a situação do Brasil em 2012.	17
Quadro 2 - Informações sobre a criação de caprinos no Brasil, regiões Nordeste e Sudeste e no estado de Minas Gerais.	18
Quadro 3 - Etapas da reação de PCR para a detecção de IS900.	39
Quadro 4 - Etapas da PCR para detecção de IS1311.	40
Quadro 5 - Produtos gerados pela restrição enzimática com as enzimas <i>MseI</i> e <i>HinfI</i> (Whittington et al., 2001).	41
Tabela 1 - Distribuição das propriedades produtoras de leite de cabra nas microrregiões da Zona da Mata de Minas Gerais.	42
Tabela 2 - Quantidade de propriedades e animais selecionados, por microrregião da Zona da Mata de Minas Gerais.	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efetivo caprino mundial em 2013, segundo a FAO.	16
Figura 2 – Distribuição da produção de leite de cabra por estado brasileiro (Fonte: IBGE, 2006).	20
Figura 3 - Mapa da localização da Zona da Mata de Minas Gerais em relação às outras mesorregiões e as suas microrregiões (Fonte: Castro & Soares, 2012).	22
Figura 4 - Mucosa intestinal espessada devido à paratuberculose (acima) e mucosa intestinal normal (abaixo). (Fonte: <i>Johne's Disease – Questions and Answers for Goat Owners</i> – http://johnes.org).	27
Figura 5 - Caprino apresentando sinal clínico de paratuberculose: emagrecimento (Fonte: <i>Johne's Disease – Questions and Answers for Goat Owners</i> – http://johnes.org).	28
Figura 6 - Resultados típicos de análise de restrição enzimática com as enzimas <i>MseI</i> e <i>HinfI</i> do produto da PCR com IS1311 com <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> (coluna 1) e Map tipo B- <i>bison</i> (coluna 2), C- <i>cattle</i> (coluna 3) e S- <i>sheep</i> (coluna 4) (Fonte: Whittington et al., 2001).	41
Figura 7 - Regime ao qual os entrevistados estavam inseridos, em relação aos estabelecimentos produtores de leite de cabra amostrados.	43
Figura 8 - Escolaridade dos produtores de leite de cabra da Zona da Mata de Minas Gerais entrevistados nesse estudo.	44

Figura 9 - Porcentagem de uso da terra com caprinocultura em oito propriedades visitadas.	45
Figura 10 - Distribuição das raças exploradas nas propriedades produtoras de leite de cabra da mesorregião da Zona da Mata de Minas Gerais.	47
Figura 11 - Exemplo de animal da raça Saanen, de aptidão leiteira. Fonte: Capritec (Disponível em: http://www.capritec.com.br/csa/Rebanho/Saanen/Reb-Saa.htm#Características . Acesso em: 07/10/2014 às 08:24h.)	48
Figura 12 - Animal da raça Parda Alpina, de aptidão leiteira (Fonte: http://www.brasilfarmavet.com.br/products/parda-alpina/ . Acesso em 07/10/14, às 08:39h).	48
Figura 13 - Mortalidade de animais adultos das propriedades produtoras de leite de cabra na mesorregião da Zona da Mata de Minas Gerais.	50
Figura 14 - Frequência de limpeza dos bebedouros nas propriedades produtoras de leite de cabra na mesorregião da Zona da Mata de Minas Gerais.	51
Figura 15 - Porcentagem de presença de outras espécies nas propriedades de caprinos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais.	55
Figuras 16.A e 16.B - Crescimento de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> em meio HEYM, a partir de amostras fecais de cabras leiteiras da Zona da Mata de Minas Gerais.	59
Figura 17 - Análise de restrição enzimática das amostras, em gel de agarose 2%, com a enzima <i>HinfI</i> . MM = marcador molecular de 100bp; CP = controle positivo de Map.	61
Figura 18 - Análise de restrição enzimática das amostras, em gel de agarose 2%, com a enzima <i>MseI</i> . MM = marcador molecular de 100bp; CP = controle positivo de Map.	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DC – Doença de Crohn

DNA – Ácido dextrorribonucleico

DVT – Departamento de Veterinária

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO - *Food and Agricultural Organization of the United Nations*

HEYM - *Herrold's Egg Yolk Medium*

HPC - Cloreto de hexadecilpiridínio

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IS – Sequência de inserção

Lanagro – Laboratório Nacional Agropecuário

Ldbac – Laboratório de doenças bacterianas

Map – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

ONG – Organização não governamental

PBS - Tampão salina fosfato

PCR – Reação da polimerase em cadeia

PFGE – Eletroforese em gel de campo pulsado

PIB – Produto interno bruto

REA – Análise de restrição enzimática (*Restriction endonuclease analysis*)

UFV – Universidade Federal de Viçosa

RESUMO

SOUZA, Marina de Castro Campos de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2015. **Caprinocultura leiteira comercial na região da Zona da Mata de Minas Gerais: organização da produção e ocorrência de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map)**. Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Paula Dias Bevilacqua, Luis Augusto Nero e Marcelo Teixeira Rodrigues

A participação da caprinocultura leiteira no cenário agropecuário brasileiro tem aumentado e vem se consolidando como rentável. Minas Gerais é o principal produtor de leite de cabra na região Sudeste e o terceiro principal estado do país nessa atividade. A paratuberculose é uma enfermidade intestinal crônica, causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), que acomete principalmente ruminantes e é transmitida pela ingestão de alimentos ou água contaminados por fezes de animais acometidos. O objetivo do trabalho foi identificar e caracterizar *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em fazendas de caprinos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. Foram estudadas dez propriedades, caracterizadas através da aplicação de um questionário com a pessoa responsável pelo manejo. Foram coletadas amostras de fezes e de leite dos 467 animais amostrados, que foram inoculadas em meio HEYM. As amostras de leite e as colônias suspeitas foram submetidas à PCR e aquelas consideradas positivas foram sequenciadas. Onze (2,36%) animais foram considerados positivos para a presença de Map, em quatro (40%) propriedades. Através das técnicas utilizadas, concluiu-se que Map está presente nas propriedades de caprinos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. Com esse estudo, foi possível analisar e caracterizar os diferentes modos de produção de leite de cabra empregados na Zona da Mata. Os produtores têm relativa instrução, mas ainda convivem com a baixa produtividade e o baixo rendimento da produção, o que leva a maioria a necessitar de outras fontes de renda. O incentivo governamental exerce papel fundamental na mudança do cenário atual da caprinocultura leiteira dessa mesorregião e, levando à estruturação da cadeia produtiva, alcança melhores resultados de produção e geração de emprego e renda no meio rural.

ABSTRACT

SOUZA, Marina de Castro Campos de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2015. **Commercial dairy goat in the Zona da Mata region of Minas Gerais : organization of production and the occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map)**. Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisers: Paula Dias Bevilacqua, Luis Augusto Nero and Marcelo Teixeira Rodrigues.

The participation of dairy goat in the Brazilian agricultural scenario has increased and has consolidated as profitable. Minas Gerais is the main producer of goat's milk in the Southeast and the third largest state in the country in this activity. The paratuberculosis is a chronic intestinal illness caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), which mainly affects ruminants and is transmitted by ingesting food or water contaminated by feces of affected animals. The objective was to identify and characterize *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy goat farms in the Zona da Mata of Minas Gerais. Ten properties were studied, characterized by applying a questionnaire to the person responsible for the handling. Samples of feces and milk were collected of 467 animals studied, and inoculated in HEYM medium. Samples of milk and suspected colonies were submitted to PCR, and the samples considered positive were sequenced. Eleven (2.36%) animals were considered positive for the presence of Map, in four (40%) properties. Through the techniques used, it was concluded that Map is present in dairy goats properties of Zona da Mata of Minas Gerais. With this study, we analyzed and characterized different types of goat production used in the Zona da Mata. Producers have relative education, but still living with low productivity and low income of their production, which leads most in need of other sources of income. The government incentive plays a fundamental role in changing the current scenario of dairy goat at this region and, leading to the structuring of the production chain, achieves better results of production and generation of employment and income in rural areas.

1. Introdução

A participação da caprinocultura leiteira no cenário agropecuário brasileiro tem aumentado e vem se consolidando como rentável, tendo como vantagem não requerer muitos investimentos ou grandes áreas para seu desenvolvimento (Silva et al., 2012). No Brasil, a caprinocultura é uma atividade predominantemente de pequenos e médios produtores e que pode ser estimulada em todos os municípios, levando-se em consideração as aptidões naturais inerentes a cada região (Embrapa, 2011). Minas Gerais é o principal produtor de leite de cabra na região Sudeste e o terceiro principal estado do país nessa atividade, sendo responsável por aproximadamente 8% do leite de cabra produzido no Brasil (IBGE, 2013).

A paratuberculose ou doença de Johne é uma enfermidade intestinal granulomatosa crônica, causada pela bactéria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), que acomete principalmente ruminantes (Chiodini et al., 1984; Clarke, 1997; Ayele et al., 2005; Mota et al., 2010). A ingestão de alimentos ou água contaminados por fezes de animais acometidos é a principal forma de transmissão (Radostits et al., 2002). Apresenta período de incubação prolongado e os sinais clínicos são as manifestações terminais da infecção, que se desenvolvem na minoria dos animais infectados, variando de acordo com o estágio da infecção (Kennedy & Benedictus, 2001). Em pequenos ruminantes, a principal manifestação é o emagrecimento progressivo, sendo que a diarreia raramente é observada ou não é severa (Stehman & Shulaw, 1996; Oliveira et al., 2010). As perdas econômicas variam consideravelmente de acordo com o país. No Brasil, ainda não se têm dados quantificando as reais perdas produtivas de rebanhos acometidos pela paratuberculose.

Foram desenvolvidos diversos testes de PCR para identificar Map utilizando como sequência-alvo a IS900, mas as cepas S (*sheep*) e C (*cattle*) apresentam resultados idênticos nesses testes. A capacidade de diferenciar as cepas pode ser grande benefício para programas de controle e erradicação da paratuberculose onde a criação mista de espécies é praticada (Marsh et al., 1999). As técnicas adequadas para o diagnóstico da doença nos rebanhos tornam-se ainda mais importantes quando se têm relatos da possível infecção

de Map em humanos, suspeitando-se de estar relacionada com a doença de Crohn (Crohn et al., 1932).

A paratuberculose, principalmente em pequenos ruminantes, ainda é pouco estudada, o que determina uma desvantagem econômica e comercial aos produtores brasileiros. Sua contribuição para os impactos econômicos e a possível correlação com a doença de Crohn instigam o aprimoramento e o desenvolvimento de técnicas mais rápidas para o diagnóstico nos rebanhos brasileiros (Schwarz et al., 2012).

Considerando que a criação de caprinos apresenta-se como uma alternativa econômica viável no espaço rural (Embrapa, 2011), estudar, conhecer e aprimorar a sanidade dos rebanhos é essencial para o desenvolvimento da atividade e para a melhoria da qualidade do leite de cabra e seus derivados.

Considerando a importância da caprinocultura para a geração de emprego e renda, principalmente no meio rural; considerando, ainda, que Minas Gerais é o terceiro principal produtor de leite de cabra no país e que, para o desenvolvimento da atividade, é necessário criar animais saudáveis e aptos a produzirem alimentos que não causem riscos à saúde humana; esse estudo se propôs a conhecer os sistemas de produção empregados na caprinocultura da Zona da Mata de Minas Gerais e investigar a presença do agente etiológico da paratuberculose nos rebanhos dessa mesorregião.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 A caprinocultura no Brasil e no mundo

Há séculos, os seres humanos têm usado caprinos para muitas finalidades (produção de leite, carne, fibras, pele, trabalho), sob várias condições. Apesar de esses animais estarem presentes em todos os continentes, observa-se que o setor é significativamente menos apoiado, quando comparado a outros setores da produção animal como leite e carne bovina, aves, suínos e equinos (Dubeuf et al., 2004).

De acordo com a FAO (*Food and Agricultural Organization of the United Nations*), o efetivo caprino mundial em 2013 correspondia a 1.005.603.003 cabeças e o continente com maior quantidade de caprinos foi a Ásia, onde estavam 59,38% dos animais (597.151.616 animais) (Figura 1).

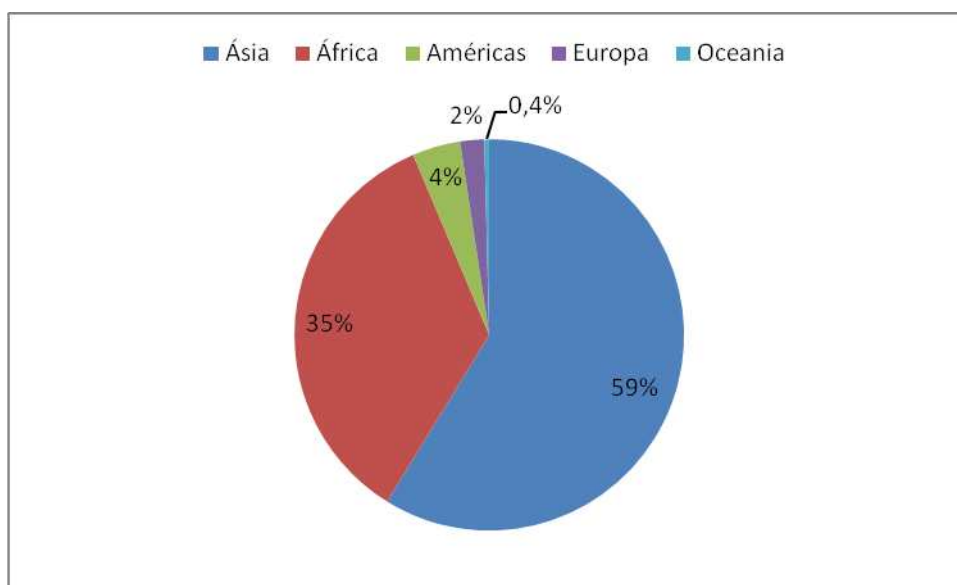


Figura 1: Efetivo caprino mundial em 2013, segundo a FAO.

A Europa tem apenas 2% do rebanho caprino mundial, mas é responsável por 18% da produção de leite de cabra do mundo. É o único continente no qual o leite de cabra tem importância econômica. A situação varia muito entre os países e a maior parte da produção é comercializada, apesar de o setor informal ainda permanecer ativo em países do sudeste europeu (Dubeuf, 2010).

Os países em desenvolvimento são os que se destacam na produção de leite, carne e derivados caprinos. Nesses países, a produção geralmente é destinada ao consumo familiar ou à comercialização em mercados locais, não sendo resultado de um setor produtivo organizado e controlado, como é o caso da bovinocultura leiteira (Dubeuf et al., 2004).

A tabela 1 mostra os principais países produtores de leite de cabra. A Índia é o maior produtor de leite de cabra em volume, mas principalmente a nível local, e o setor de produção de caprinos leiteiros parece ser mais desestruturado do que de vacas leiteiras. Apesar das várias iniciativas de organizações não-governamentais (ONGs) na Ásia, a importância da indústria do leite de cabra nos países desse continente continua a ser baixa (Dubeuf et al., 2004).

Em muitos países, a carne é mais importante que o leite devido a preferências culturais. Na Índia, por exemplo, a carne de caprinos equivale a 47% do total de carnes consumidas, uma vez que o consumo de carne bovina é reduzido devido a questões religiosas (Dubeuf, 2010).

Quadro 1: Principais países produtores de leite de cabra e a situação do Brasil em 2012.

Países	Produção de leite de cabra (toneladas)	Ranking
Índia	4.850.000	1º
Bangladesh	2.608.000	2º
Paquistão	779.000	3º
Mali	715.000	4º
França	624.016	5º
Brasil	150.000	20º

(Fonte: FAO, 2012)

No Brasil, observa-se tendência de crescimento e evolução da atividade, com a caprinocultura se consolidando como importante alternativa pecuária. Verifica-se aumento significativo nas explorações para produção de leite, assim como para produção de carne e pele. Os numerosos eventos agropecuários

realizados atualmente, exclusivos ou com a participação de caprinos e ovinos, também refletem o grande interesse na atividade (Silva et al., 2012).

A tabela 2 mostra os dados de criação de caprinos no Brasil. Segundo o Censo Agropecuário de 2006 (IBGE, 2006), havia 7.107.613 caprinos no país, o que revela um crescimento de 7,84% em relação a 1996, associado ao aumento do consumo de leite, queijos e carnes desta espécie neste período. Havia 286.676 estabelecimentos criadores de caprinos no país, o que resulta em número médio de 25 animais por criação. Destes, apenas 18.063 (6,3%) eram produtores de leite (IBGE, 2006).

Quadro 2: Informações sobre a criação de caprinos no Brasil, regiões Nordeste e Sudeste e no estado de Minas Gerais.

	Brasil	Região Nordeste	Região Sudeste	Minas Gerais
Efetivo de caprinos	7.107.613	6.470.898	159.463	78.426
Estabelecimentos criadores de caprinos	286.676	249.487	10.185	5.317
Estabelecimentos produtores de leite de cabra	18.063	14.933	1.831	952
Produção de leite de cabra (litros)	35.740.188	26.780.781	6.194.894	3.020.890

(Fonte: IBGE, 2006)

A região Nordeste destaca-se no cenário produtivo de caprinos, com 91% dos animais e 87% dos estabelecimentos criadores de caprinos do país (IBGE, 2006). Ao longo de décadas, a caprinovinocultura foi considerada atividade marginal ou de subsistência nesta região, normalmente com baixa produtividade e realizada por produtores desprovidos de capital financeiro e de recursos tecnológicos. Entretanto, atualmente, a produção de pequenos ruminantes vem se caracterizando como atividade de grande importância cultural, social e econômica para a região, desempenhando papel crucial no desenvolvimento do Nordeste brasileiro (Costa et al., 2008).

Na Região Sudeste, existem 159.463 cabeças de caprinos em 10.185 criações desta espécie, o que corresponde a 2,24% e 3,55% em relação ao Brasil, respectivamente. Nesta região, Minas Gerais é o estado que tem o maior contingente populacional (49,18%) e de estabelecimentos criadores (52,2%). A exploração nessa região caracteriza-se pelo uso de sistemas intensivos, em sua maioria em pequenas áreas próximas aos centros urbanos. Nesses sistemas, animais de raças leiteiras especializadas como Saanen, Alpina e Toggenburg são as mais comuns, assim como os mestiços dessas raças (Borges, 2003).

A indústria de leite de cabra e derivados depende da concorrência com a de vaca, ovelhas e até mesmo de búfala. Apesar de os produtos de cabra serem vendidos, geralmente, para mercados específicos, sua rentabilidade e vantagem competitiva dependem do preço relativo e organização dos sistemas de produção de caprinos (produção sazonal, tamanho dos rebanhos, produtividade e características do leite de cabra) (Dubeuf et al., 2004).

A participação da caprinocultura leiteira no cenário agropecuário brasileiro tem aumentado de forma significativa, superando o desafio de conquistar e manter novos mercados para o leite de cabra e seus derivados. Esta atividade vem se consolidando como rentável e não requer muitos investimentos ou grandes áreas para seu desenvolvimento. Visto isso, a caprinocultura leiteira é uma das alternativas mais favoráveis para a geração de emprego e renda no meio rural (Silva et al., 2012).

Entre 1975 e 2006, a produção de leite de cabra no Brasil aumentou 167%, sendo que em 2006 foram produzidos 35.740.188 litros, vendidos a um preço médio de R\$ 1,22 por litro (IBGE, 2006). Apenas 10,14% dos estabelecimentos produtores de leite de cabra do país situam-se na Região Sudeste, que é responsável por 17,33% da sua produção, onde o estado de Minas Gerais recebe destaque por produzir 48,76% do total da região. Neste estado, há 952 estabelecimentos produtores de leite de cabra, o que corresponde a 52% da região. Minas Gerais é responsável por 8,45% do leite de cabra produzido no país, atrás apenas dos estados da Bahia (33,33%) e Paraíba (12,41%), conforme é visto na Figura 2.

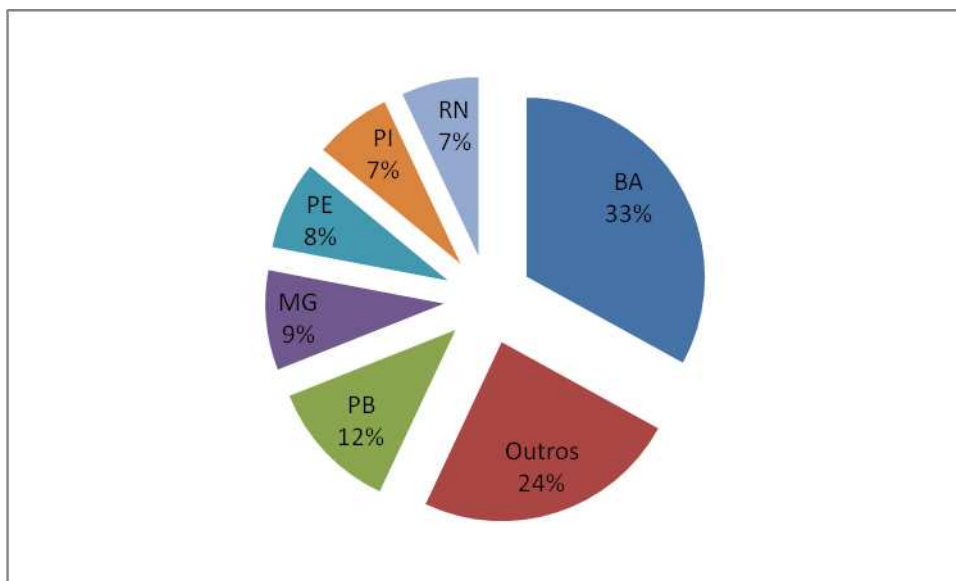


Figura 2: Distribuição da produção de leite de cabra por estado brasileiro (Fonte: IBGE, 2006).

A ausência de legislação sanitária específica trouxe graves consequências, como a introdução de doenças anteriormente exóticas nos plantéis nacionais, disseminação de agentes patogênicos anteriormente mais frequentes em rebanhos do Nordeste, resultando em perda de animais e restrições no comércio internacional de animais e seus produtos, além das doenças já tradicionalmente conhecidas, decorrentes de manejo inadequado (Guimarães, 2006).

No Brasil, a caprinocultura é uma atividade predominantemente de pequenos e médios produtores e que pode ser estimulada em todos os municípios brasileiros, apresentando-se como uma alternativa econômica viável (Embrapa, 2011).

2.2 A Zona da Mata do Estado de Minas Gerais

Geografia

O estado de Minas Gerais é dividido, segundo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em doze mesorregiões: Norte, Noroeste, Central, Jequitinhonha, Vale do Mucuri, Triângulo/Alto Paranaíba, Oeste, Sul/Sudoeste, Vale do Rio Doce, Metropolitana de Belo Horizonte, Zona da Mata e Campo das Vertentes (IBGE, 2002).

A mesorregião Zona da Mata abrange área de 35.726 km², cerca de 6% do estado de Minas Gerais. Localiza-se a sudeste no Estado e é dividida em sete microrregiões: Ponte Nova, Manhuaçu, Viçosa, Ubá, Muriaé, Juiz de Fora e Cataguases constituída por 142 municípios (Figura 3) (Castro & Soares, 2012).

Em 2011, a Zona da Mata se encontrava em 4º lugar no PIB (produto interno bruto) estadual, com total de R\$ 28.850.550, atrás das regiões Central, Sul e Triângulo Mineiro (Castro & Soares, 2012).

Segundo o IBGE (2002), o clima da região é bastante variado, recebendo forte influência da variação altimétrica. O clima pode ser quente (média acima de 18°C em todos os meses do ano), subquente (média entre 15°C e 18°C em pelo menos um mês) e mesotérmico brando (temperaturas médias entre 10 a 15°C).

Liderado pelo município de Juiz de Fora, a região Centro-Sul da Zona da Mata tem os melhores indicadores socioeconômicos, com uma infra-estrutura e padrão de dinamismo diversificados das demais regiões. Suas indústrias de maior destaque atuam na metalurgia do zinco na siderurgia e no setor automobilístico. O município de Ubá destaca-se pela indústria moveleira, ocupando o quarto lugar como pólo moveleiro do Brasil e Cataguases pela indústria têxtil e a produção de energia elétrica (Castro & Soares, 2012).

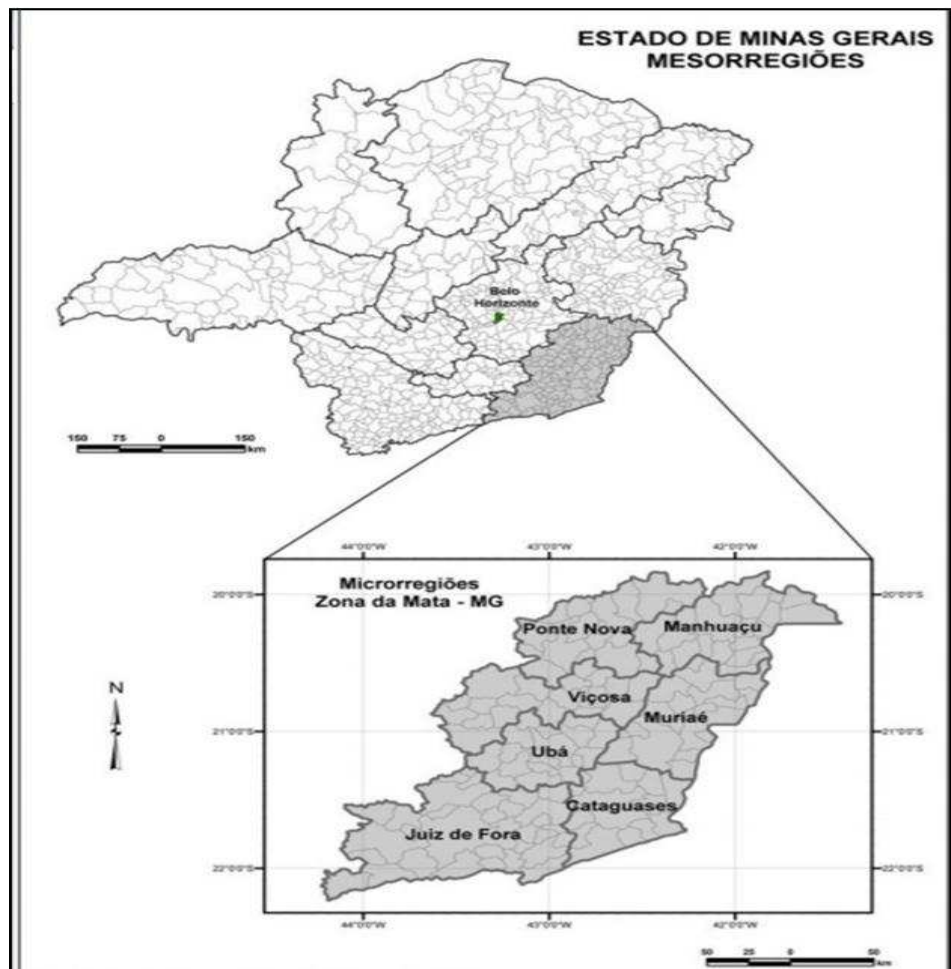


Figura 3: Mapa da localização da Zona da Mata de Minas Gerais em relação às outras mesorregiões e as suas microrregiões (Fonte: Castro & Soares, 2012).

Caprinocultura leiteira

A partir de 1974, Minas Gerais foi pioneiro no desenvolvimento da caprinocultura leiteira, importando caprinos de raças especializadas de países da Europa, Estados Unidos e Canadá, e evoluiu tecnicamente nestes 40 anos (Gouveia et al., 2009). Após 1997, houve crescimento constante do número de animais no estado, porém foi concentrado em algumas regiões, como Norte de Minas, Sul/Sudoeste de Minas e Zona da Mata. O conhecimento da distribuição do efetivo caprino por mesorregião é importante para que políticas públicas e privadas, sejam sócio-econômicas ou sanitárias, possam ser direcionadas para esses locais, onde podem atingir maior número de animais e de criadores (Guimarães, 2006).

O conhecimento dos perfis epidemiológicos da caprinocultura em Minas Gerais é fundamental para minimizar a introdução de agentes infecciosos no estado, através da compra de animais sem critérios sanitários adequados e do trânsito entre as unidades da Federação, que são a causa da elevação dos gastos com medidas terapêuticas e de controle (Assis & Gouveia, 1994). Por outro lado, os dados de caracterização da atividade em Minas Gerais são escassos e carecem de suporte para orientar ações de pesquisa, extensão e defesa sanitária (Guimarães, 2006).

A pouca informação tem limitado a implantação de medidas profiláticas, socioeconômicas e de mercado na atividade caprina, que esbarra na falta de dados relativos ao número e localização de criatórios de caprinos e no consequente desconhecimento do real número de criadores e das condições e características de criação (Guimarães, 2006).

Para que ocorra o desenvolvimento do setor na Zona da Mata, é necessário o estabelecimento de legislações sanitárias e comerciais, assim como o fortalecimento das associações de criadores e instituições de pesquisa (Souza et al., 2014).

2.3 Paratuberculose em pequenos ruminantes

Em 1895, Johne & Frothingham publicaram um relato de caso que foi considerado “um caso singular de tuberculose bovina”, denominada inicialmente de pseudotuberculose, depois de doença de Johne (McFadyen, 1906) e paratuberculose (Bang, 1910). Em pequenos ruminantes, a doença foi relatada pela primeira vez na Grécia, em 1965 (Dimareli-Malli et al., 2013). O agente causador desta enfermidade foi isolado pela primeira vez por Twort & Ingram (1912) e atualmente é classificado como *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map).

Map pertence à família Mycobacteriaceae e à ordem Actinomycetales. Baseado em análises bioquímicas e genéticas, a espécie *Mycobacterium avium* pode ser dividida em três subespécies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum* e *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Estes são bastonetes aeróbicos, imóveis, catalase positiva, sendo considerados Gram positivos (Timms et al., 2011). Por apresentarem grande quantidade de ácido micólico e

lipídios na parede celular, coram-se melhor pela técnica de Ziehl-Neelsen, sendo classificados como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Quinn et al., 2005). Os ácidos micólicos diminuem a permeabilidade da parede celular, o que aumenta a resistência contra a lise bacteriana, variações de temperatura e ações de antimicrobianos (Lilenbaum et al., 2007).

As micobactérias são conhecidas pela sua resistência a danos físicos e químicos devido à baixa permeabilidade da parede celular, o que permite que *Map* sobreviva no ambiente por longos períodos, característica importante a ser considerada quando se refere ao modo de transmissão deste agente. A tolerância ao calor é outro fator importante na transmissão de *Map*, principalmente a humanos (Sibley, 2005). *Map* é capaz de formar biofilmes em bebedouros de animais e este biofilme exerce papel crucial na infectividade dessa bactéria. Como outras bactérias, *Map* em biofilmes é mais resistente ao estresse químico que as bactérias livres na água, o que pode contribuir para a sua sobrevivência no ambiente. A sobrevivência de *Map* no esterco e no solo aumenta as oportunidades de contato entre o agente e animais e, ainda, aumenta a chance de contaminação de águas superficiais através da precipitação e/ou da irrigação (Singh et al., 2013).

O tratamento térmico a 63°C por 30 minutos elimina 100% dos isolados de *Mycobacterium bovis*, mas, sob as mesmas condições, 5 a 9% de *Map* sobrevivem e, desse modo, pode ser resistente à pasteurização comercial (Chiodini & Hermon-Taylor, 1993). Diversos estudos (Grant et al., 1999; Giese & Ahrens, 2000; Singh & Vihan, 2004; Nebbia et al., 2006; Dimareli-Malli, 2010) foram desenvolvidos objetivando detectar *Map* no leite e, entre eles, Carvalho et al. (2012) recuperaram cepas viáveis de *Map* de leite de vaca pasteurizado.

Baseado na comparação do genoma inteiro de *Map*, um esquema de evolução bifásica tem sido proposto, distinguindo duas principais linhagens: bovina e ovina. Além de diferenças genotípicas, as cepas pertencentes a estas duas linhagens apresentam diferenças fenotípicas, que incluem as taxas de crescimento, utilização de diferentes vias metabólicas de ferro (Janagama et al., 2010), entre outras. A associação de cada linhagem com o hospedeiro bovino ou ovino não é exclusiva, pois as cepas representativas de cada linhagem podem causar doença em todos os tipos de ruminantes (Biet et al., 2012).

Historicamente, cepas que pertencem à linhagem ovina têm sido referidas como S (*sheep*) e as cepas da linhagem bovina como C (*cattle*), de acordo com a espécie da qual foram isoladas pela primeira vez. Com os avanços da tecnologia de tipagem molecular, foram detectadas maiores diferenças genéticas entre os dois tipos de cepas. A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) revelou três tipos de cepas (I, II, III). O tipo II é sinônimo do tipo C (*cattle*) e os tipos I e III compreendem o tipo S (*sheep*) (Castellanos et al., 2011). Whittington et al. (2001) confirmaram novo tipo de Map através da análise de restrição enzimática (REA): tipo B (*bison*), isolada inicialmente dessa espécie animal e com características fenotípicas de crescimento in vitro distintas da cepa tipo C (*cattle*).

As sequências de inserção (IS – *insertion sequences*) são um tipo de repetição de DNA, conhecido como repetições dispersas, que consistem em múltiplas cópias dos genes duplicados ou de elementos genéticos móveis. A mobilidade destes elementos constitui fonte de plasticidade genética e pode ser responsável por diversos rearranjos ou deleções de cromossomos. Em Map, 1,5% do genoma correspondem a estes elementos (Castellanos et al., 2011). O sequenciamento genético de Map K-10 (GenBank No. AE016958) revelou 17 cópias de IS900, sete cópias de IS1311 e três cópias de ISMav2, além de 16 outras sequências de inserção (Li et al., 2005).

IS900 foi a primeira IS identificada e descrita para o gênero *Mycobacterium* (Green et al., 1989). Esta sequência tem 1.451 pares de base (pb) e apresenta uma ORF de 1.197 pb entre os nucleotídeos 236 e 1.432. Esta ORF codifica uma transposase hipotética de 399 aminoácidos (p43) e uma proteína desconhecida (*hed*) (Castellanos et al., 2011). Diversos métodos moleculares rápidos utilizam como sequência-alvo a IS900, como a PCR *multiplex*, *nested* PCR, PCR em tempo real, entre outros (Carvalho et al., 2009). A presença de IS900 no genoma de Map fornece a esse micro-organismo vantagem evolutiva, como a patogenicidade relevante (Green et al., 1989)

Apesar de IS1311 estar presente em *M. avium* e em Map, cinco mutações pontuais diferenciam as sequências de IS1311 entre as duas subespécies (Whittington et al., 1998). Tais mutações podem ser utilizadas como alvo na análise de restrição enzimática (REA - *Restriction endonuclease analysis*) para realizar a diferenciação entre *M. avium* e Map. Além disso, algumas cópias de

IS1311 da cepa C (*cattle*) de Map contêm uma mutação adicional que pode ser utilizada para diferenciá-la da cepa S (*sheep*) (Whittington et al., 1998).

A paratuberculose é uma doença contagiosa crônica do trato intestinal que afeta predominantemente ruminantes domésticos e silvestres (Chiodini et al., 1984; Clarke, 1997; Ayele *et al.*, 2005; Mota et al., 2010). A ingestão de alimentos ou água contaminados por fezes de animais acometidos é a principal forma de transmissão (Radostits et al., 2002), embora haja relatos de transmissão vertical e transmamária em ovinos (Lambeth et al., 2004). Apesar de a rota primária de transmissão de Map em caprinos seja fecal-oral (Stehman, 1996), em propriedades dedicadas à engorda e à reprodução, as transmissões intrauterina ou através do colostro também são importantes e podem contribuir para a ocorrência e manutenção do agente nos rebanhos (Freitas et al., 2015).

Uma vez no intestino do hospedeiro, o patógeno é transportado através da mucosa epitelial, provavelmente através das células M do íleo, e então penetra e persiste em macrófagos subepiteliais. A sobrevivência da bactéria dentro dos macrófagos do trato intestinal é fundamental para a patogênese da paratuberculose (Siguroardóttir et al., 2004). Para isso, a bactéria e/ou seus componentes desativam a maquinaria do macrófago que coordena os mecanismos de defesa antibacteriana (Valetin-Weigand & Goethe, 1999). Através da inibição da maturação e acidificação dos fagossomos, Map impede um mecanismo bactericida importante e, através da alteração do padrão de produção de citocinas, interfere nos processos inflamatórios e imunológicos (Siguroardóttir et al., 2004).

Os animais são mais suscetíveis à infecção nos primeiros meses de vida. Ruminantes adultos são mais difíceis de serem infectados, pois ocorre o desenvolvimento de resistência associada à idade, cuja natureza pode estar relacionada ao desenvolvimento do tecido linfóide intestinal (Kennedy & Benedictus, 2001).

A paratuberculose é, principalmente, uma infecção subclínica. Apresenta período de incubação prolongado e os sinais clínicos são as manifestações terminais da infecção, que se desenvolvem na minoria dos animais infectados, variando de acordo com o estágio da infecção (Kennedy & Benedictus, 2001). O primeiro estágio pode durar dois a cinco anos e os animais infectados não

apresentam sinais e não eliminam o agente nas fezes. O segundo estágio também é subclínico, mas os animais acometidos eliminam Map nas fezes. Já no terceiro estágio, os sinais são evidentes e a eliminação fecal da bactéria torna-se mais intensa. Uma vez que o animal desenvolve a doença clínica, eventualmente morre, devido ao espessamento da parede intestinal (Figura 4), bloqueando a absorção normal do alimento. (Sibley, 2005).

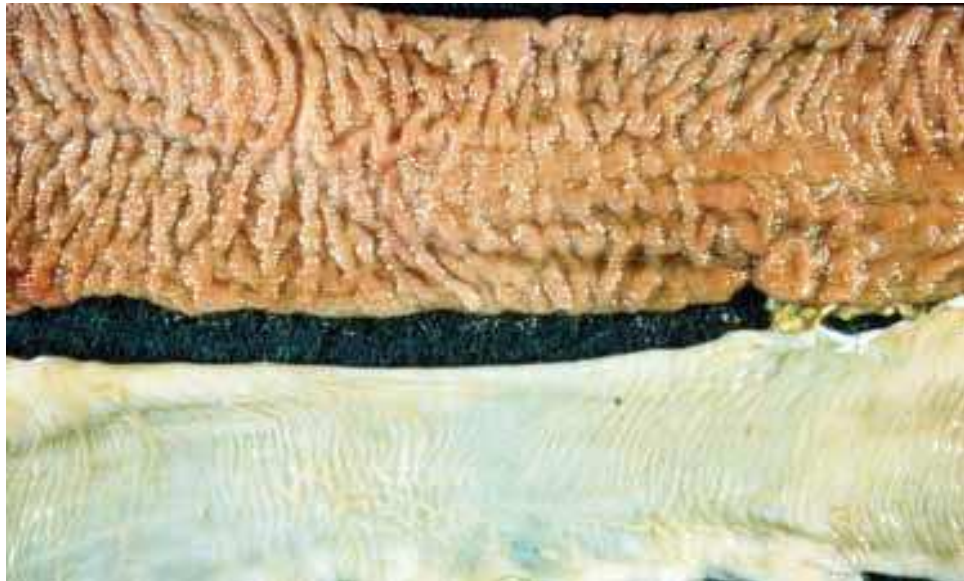


Figura 4: Mucosa intestinal espessada devido à paratuberculose (acima) e mucosa intestinal normal (abaixo), ambas de caprinos. (Fonte: Johne's Disease – Questions and Answers for Goat Owners – Disponível em: <<http://johnes.org>>. Acesso em 18/08/2014, às 09h26min.)

Em ruminantes, a doença clínica é caracterizada pela perda de peso progressiva (Figura 5) e afebril que leva à emaciação, edema submandibular, queda da qualidade do couro e da produção de leite, apesar da manutenção do apetite. Em bovinos, o principal sinal é diarreia crônica e intermitente (Kennedy & Benedictus, 2001). Entretanto, em pequenos ruminantes, a principal manifestação é o emagrecimento progressivo, sendo que a diarreia raramente é observada ou não é severa (Stehman & Shulaw, 1996; Oliveira et al., 2010). Independentemente da evolução clínica aparente dos animais infectados, estes eliminam maior quantidade do micro-organismo pelas fezes e menor quantidade pelo leite (Larsen et al., 1975).



Figura 5: Caprino apresentando sinal clínico de paratuberculose: emagrecimento (Fonte: John's Disease – Questions and Answers for Goat Owners – Disponível em: <<http://johnes.org>>. Acesso em 18/08/2014, às 09h26min.)

A infecção por *Map* causa enterite granulomatosa crônica em ruminantes. A resposta imune exerce papel importante na determinação do tipo de resposta histopatológica em infecções micobacterianas. As lesões encontradas em caprinos podem ser classificadas em: focal, multibacilar difusa, linfocítica difusa ou mista. As lesões focais são compostas de pequenos granulomas formados por macrófagos com núcleo grande e claro e citoplasma abundante. As lesões multibacilares são caracterizadas por enterite granulomatosa difusa composta por grupos de macrófagos distribuídos de maneira difusa na mucosa do íleo e do jejuno. Nas placas de Peyer, os macrófagos formam granulomas bem definidos ou difusamente infiltrados no tecido linfoide. No caso das lesões linfocíticas, a principal célula inflamatória são os linfócitos infiltrados na lâmina própria, nem sempre associados às placas de Peyer. As lesões mistas apresentam os dois tipos celulares (Corpa et al., 2000). Khodakaram Tafti & Rashidi (2000) relataram que as lesões encontradas em caprinos podem se manifestar de forma leve, com a mucosa intestinal opaca e espessa, até à forma grave com corrugações e edema da mucosa do intestino terminal associado ao comprometimento dos linfonodos mesentéricos.

Map é uma bactéria fastidiosa para o crescimento *in vitro*. Os meios para cultivo podem ser líquidos, como o caldo *Middlebrook 7H9*, ou sólidos que incluem *Lowenstein-Jensen*, *Lowenstein-Jensen* modificado e meio *Herrold* gema de ovo (*Herrold's Egg Yolk Medium* – HEYM) (Whipple et al., 1991). Quando Map é cultivada do ambiente, de animais ou de humanos, a amostra deve ser descontaminada para remover espécies microbianas de crescimento mais rápido e permitir a identificação da população micobacteriana, de crescimento mais lento. O processo padrão de descontaminação inclui o cloreto de hexadecilpiridínio (HPC) 0,6 a 0,9% ou hidróxido de sódio por 3 a 16 horas (Timms et al., 2011). Há poucos estudos sobre a eficácia dos meios de cultura para o isolamento de Map, e a maioria considera a espécie de origem ao invés do tipo da cepa de Map (De Juan et al., 2006a).

O meio HEYM contém diversos ingredientes que favorecem o crescimento de Map e evitam a contaminação por outros micro-organismos. O ovo contribui com fosfolipídios para neutralizar a atividade bactericida residual do HPC. Como o HPC é relativamente ineficiente para eliminar fungos contaminantes, a anfotericina B, exercendo este papel, aumenta a seletividade do meio. O ácido nalixídico inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas e a vancomicina inibe as Gram positivas. O corante verde malaquita ajuda a controlar os contaminantes e melhora a visibilidade das colônias. A gema do ovo e o glicerol fornecem ácidos graxos e outros nutrientes requeridos para o metabolismo de Map (Payeur, 2005).

Independentemente do meio usado para o cultivo, todos exigem a suplementação com micobactina *J* para o crescimento de Map, pois possibilita a utilização de ferro por esta bactéria (Thorel et al., 1990). Micobactinas são sideróforos produzidos por micobactérias sob condições limitantes de ferro, sendo que muitas espécies deste gênero produzem mais de cinco tipos de micobactina (Barclay & Ratledge, 1983). As micobactérias patogênicas encontram ampla variedade de fatores estressantes dentro das células hospedeiras e a sua habilidade de superar a deficiência do ferro representa o principal determinante de virulência (Janagama et al., 2010). A dependência de micobactina de Map pode desaparecer após várias passagens *in vitro* e a micobactina *J*, produzida por Map, difere estruturalmente daquela produzida por *M. avium* e *M. intracellulare* (Barclay et al., 1985; Timms et al., 2011). O

estudo de Janagama et al. (2010) revelou que há diferenças marcantes nas vias metabólicas usadas por cepas S (*sheep*) e C (*cattle*) de Map para adaptar à deficiência de ferro.

Apesar do seu crescimento *in vivo* ser relativamente rápido, *in vitro* é extremamente lento, sendo necessárias aproximadamente 12 a 16 semanas de incubação a 37°C para o surgimento das primeiras colônias (Collins et al., 1993). A morfologia das colônias de Map é bem característica, mas pode apresentar variações de acordo com o meio de cultura utilizado (Collins, 2003). Em meio sólido HEYM, elas são pequenas, medindo entre 1 a 2 mm (Grant, 2005), geralmente apresentam coloração branca, lisas e convexas, enquanto que em ágar *Middlebrook* elas tornam-se mais rugosas (Collins, 2003).

O isolamento de Map de tecidos ou amostras fecais apresenta 100% de especificidade (Shin et al., 2004). O cultivo coprológico, apesar de suas limitações em relação ao longo tempo de crescimento e facilidade de contaminação, ainda é o “padrão ouro” para o diagnóstico da paratuberculose (Collins et al., 1993). O principal desafio no diagnóstico é a identificação de animais infectados, mas sem sinais clínicos. O cultivo consegue identificar animais que eliminam 100 micro-organismos por grama de fezes, entretanto, este método é lento, caro e apresenta apenas 50% de sensibilidade (Lilenbaum et al., 2007).

O desenvolvimento de testes rápidos para a detecção de micro-organismos de crescimento lento tornou-se possível por meio de técnicas de biologia molecular (Hawkey, 1994). O descobrimento da IS900 no genoma de Map e o desenvolvimento da reação da polimerase em cadeia (PCR) revolucionaram o diagnóstico da paratuberculose (Green et al., 1989; Stevenson & Sharp, 1997).

Como há, aproximadamente, 15 a 18 cópias da IS900 no genoma, os ensaios de PCR que a detectam são altamente sensíveis e podem ser utilizados para detectar e identificar Map em culturas primárias em estágios iniciais de crescimento e em amostras de leite e tecidos (Whittington et al., 1998). Entretanto, esta técnica apresenta desvantagens, entre elas: excesso de DNA não específico, presença de substâncias que podem inibir a amplificação, qualidade da preparação do DNA, detecção de material genômico e não de células viáveis, entre outras (Khare et al., 2004). Deste modo, a padronização

da técnica para cada tipo de amostra é fundamental para o diagnóstico confiável (Carvalho, 2008).

Foram desenvolvidos diversos testes de PCR para identificar Map utilizando como sequência-alvo a IS900, mas as cepas S (*sheep*) e C (*cattle*) apresentam resultados idênticos nestes testes (Marsh et al., 1999). Para propósitos epidemiológicos, é desejável diferenciar os isolados de Map.

A capacidade de diferenciar rapidamente as cepas S (*sheep*) e C (*cattle*) pode apresentar um grande benefício para programas de controle e erradicação da paratuberculose onde a criação mista de espécies é praticada. As práticas de manejo atuais são realizadas considerando que bovinos não são suscetíveis à infecção pela cepa S (*sheep*) e que podem alimentar-se de forma segura no pasto, após a retirada dos ovinos. Um teste rápido e sensível que confirme a presença de Map e diferencie entre os tipos de cepas poderia ajudar a garantir que as práticas de manejo sejam baseadas tecnicamente (Marsh et al., 1999).

As técnicas adequadas para o diagnóstico da doença nos rebanhos tornam-se ainda mais importantes quando se têm relatos da possível infecção de Map em humanos, suspeitando-se de estar relacionada com a doença de Crohn (DC), uma inflamação crônica do intestino humano que acomete predominantemente o íleo e o cólon (Crohn et al., 1932), resultando em perdas de proteínas e síndrome da má absorção (Ellingson et al., 2003). Devido não apenas às similaridades clínicas, mas também histopatológicas encontradas em humanos com enterite granulomatosa crônica e animais com paratuberculose, inferiu-se em 1913 uma mesma teoria causal para as duas doenças (Dalziel, 1913). No entanto, existem estudos que não correlacionam MAP com a DC (Ellingson et al., 2003) e outros que obtiveram resultados positivos para essa correlação (Rocca et al., 2010; Naser et al., 2000; Naser et al., 2004).

A paratuberculose é distribuída por todo o mundo e sua prevalência varia de acordo com a região e país. No Brasil, a primeira identificação da doença foi registrada em 1915 em bovinos importados da Bélgica para o Rio de Janeiro (Dupont, 1915). Darcorso Filho et al. (1960) identificaram a doença em bovinos nascidos e criados no Brasil. Os métodos para determinar a prevalência da paratuberculose em diferentes estados brasileiros ainda são

fundamentados em diferentes metodologias, apresentando resultados que não possibilitam uma avaliação total do acometimento dos rebanhos no país. Na Paraíba, Oliveira et al. (2010) comprovaram a infecção natural de Map em caprinos e ovinos, através das lesões histopatológicas características da doença e pela presença de BAAR no citoplasma de macrófagos e linfócitos. Recentemente, estudo realizado em 14 municípios desse mesmo estado, revelou que, entre os animais testados, 45% caprinos e 54% ovinos foram positivos sorologicamente para MAP (Medeiros et al., 2012).

Os programas de controle da paratuberculose apresentam algumas diferenças entre os países e regiões. Em geral, os produtores optam por eliminar animais com sinais clínicos. A erradicação da doença é um objetivo difícil de ser atingido, devido à baixa sensibilidade dos testes disponíveis para diagnóstico. Além disso, o período de incubação prolongado e a eliminação do agente sem manifestação clínica permitem a disseminação antes da sua identificação bem sucedida. Os programas de controle são baseados em procedimentos de manejo do rebanho, como a lavagem e desinfecção das instalações com produtos específicos e separação entre animais jovens e adultos. Deve ser fornecido leite pasteurizado de fêmeas sadias aos lactantes. O único método que consegue garantir que um animal infectado não vai ser introduzido em um rebanho livre da doença é a manutenção do rebanho fechado (Lilenbaum et al., 2007).

Vacinas contra a paratuberculose estão disponíveis comercialmente apenas em algumas regiões da América do Norte e Europa, onde as perdas econômicas são significativas, mas a eficácia das vacinas não está completamente comprovada. A vacinação interfere no diagnóstico da paratuberculose e da tuberculose, causando resultados falso-positivos, o que pode levar à eliminação de animais saudáveis (Lilenbaum et al., 2007). A vacinação auxilia na prevenção da doença clínica, mas não necessariamente previne a infecção. Assim, se for necessário realizar diagnóstico da infecção em vacinados, é aconselhável a utilização de testes de detecção de antígenos de Map em amostras de fezes ou tecidos (OIE, 2014).

As perdas econômicas variam consideravelmente de acordo com o país. No Brasil, ainda não se têm dados quantificando as reais perdas produtivas de rebanhos acometidos pela paratuberculose. Nos Estados Unidos, Ott et al.

(1999) verificaram perdas nos rebanhos bovinos leiteiros entre 200 a 250 milhões de dólares por ano. Bush et al. (2006) identificaram, na Austrália, perdas médias acima de 13 mil dólares por ano por propriedade de pequenos ruminantes.

Como visto, a paratuberculose caprina ainda é pouco estudada em todo o mundo, no entanto, é verificado que o agente circula nos rebanhos. Esse quadro de carência de informações determina desvantagem econômica e comercial aos produtores brasileiros, pois a falta de diagnóstico efetivo e o limitado conhecimento da real circulação do agente nos rebanhos pode resultar em expressivas perdas na produção leiteira, refugo precoce de animais e, futuramente, poderá vir a ser uma barreira para a exportação de produtos e subprodutos desses rebanhos. Sua contribuição para os impactos econômicos e a possível correlação com a DC instigam o aprimoramento e o desenvolvimento de técnicas mais rápidas para o diagnóstico nos rebanhos brasileiros (Schwarz et al., 2012).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em fazendas de caprinos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais e caracterizar os sistemas de produção empregados.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever as características produtivas da atividade, e práticas sanitárias, nutricionais e reprodutivas adotadas nas propriedades selecionadas, além das características sócio-demográficas do entrevistado;
- Determinar a ocorrência de infecção por Map na Zona da Mata;
- Caracterizar geneticamente os isolados obtidos.

4. Material e Métodos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV) e registrado sob o número 12/2013 (Anexo 1).

4.1 Seleção das propriedades e dos animais

A partir de uma listagem geral de 41 propriedades de caprinos leiteiros da mesorregião da Zona da Mata do estado de Minas Gerais, obtida através do laticínio que compra o leite de cabra da região, foram selecionadas dez (24%) propriedades. O contato inicial com os produtores foi realizado por telefone, através do qual era explicado o objetivo do estudo e solicitada autorização para a visita à propriedade.

Nestas propriedades, foi analisada a distribuição dos animais por faixa etária e foram selecionados animais adultos (acima de seis meses), de forma que incluísse apenas aqueles em lactação, aleatoriamente. A amostragem para cada propriedade foi determinada pelo programa OpenEpi[®] (disponível em <http://www.openepi.com>), considerando-se prevalência estimada de 5%, precisão 4% e intervalo de confiança 95%.

4.2 Caracterização das propriedades

As propriedades foram caracterizadas através da aplicação de um questionário (Anexo 3) com a pessoa responsável pelo manejo dos animais. Foram realizadas perguntas quanto a características do entrevistado e da propriedade e seus aspectos econômicos, produtivos, sanitários, nutricionais e reprodutivos. Antes da aplicação do questionário, foram esclarecidos os objetivos do estudo e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, em duas vias (Anexo 3). Os questionários foram aplicados sempre pela pesquisadora principal, ao final dos procedimentos de coleta de amostras.

4.3 Coleta de amostras

Para a coleta de leite, foi realizada a higiene inicial da ordenha, de acordo com o manejo de cada propriedade, seguido pela limpeza dos tetos com álcool 70% e secagem com papel toalha. Os três primeiros jatos de leite foram descartados. Foram coletados 40 mL de leite em tubos de polipropileno de 50 mL previamente esterilizados e identificados, sendo 20 mL de cada teto.

As amostras de fezes foram coletadas individualmente, via retal, utilizando luvas descartáveis e, posteriormente, transferidas para frascos previamente esterilizados e identificados.

Todas as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo até a chegada ao Laboratório de Doenças Bacterianas do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (Ldbac/DVT/UFV). Imediatamente após a chegada ao laboratório, as amostras de fezes e leite foram submetidas aos processamentos descritos no item 4.4.

4.4 Análise microbiológica

Preparo do meio Herrold Egg Yolk Medium (HEYM)

Para o preparo do meio *Herrold Egg Yolk Medium* (HEYM) com e sem micobactina *J* (Allied Monitor, Inc., Fayette, MO, EUA), seguiu-se a metodologia proposta no Capítulo 2.2.6 do Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2006). A micobactina *J* foi adicionada ao meio na concentração de 2 mg/L. Os reagentes e suas proporções estão descritos no Anexo 2. Para cada lote de meio HEYM preparado com e sem micobactina *J*, tubos controles positivo e negativo foram incubados a 37°C, para verificação de sucesso no preparo do meio.

Processamento das amostras de fezes

O processamento das amostras de fezes seguiu a metodologia descrita por Stabel (1997). Foram pesados 2 g de fezes e colocados em tubos de polipropileno de 50 mL autoclavados, contendo 20 mL de água destilada autoclavada. Posteriormente, os tubos foram submetidos à agitação de 110

rpm por 60 minutos e, em seguida, mantidos em repouso por 45 minutos à temperatura ambiente, para sedimentação. Após a sedimentação, 5 mL da parte superior do sobrenadante foram retirados e colocados em tubos de polipropileno de 50 mL contendo 20 mL de solução de cloreto de hexadecilpiridínio (HPC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 0,9% e mantidos à temperatura ambiente, durante a noite, para descontaminação.

Após o tempo de descontaminação, os tubos foram centrifugados a 1700 x g, por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi ressuscitado em 1 mL de solução antimicrobiana contendo ácido nalidíxico (50 mg/L), cloridrato de vancomicina (50 mg/L) e anfotericina B (150 mg/L). Desta suspensão, 150 µL foram inoculados em quatro tubos de meio HEYM inclinado, sendo dois contendo micobactina *J* e dois sem o sideróforo. O restante da suspensão foi transferido para tubos de polipropileno de 1,5 mL autoclavados que foram mantidos a 8°C, para reinoculação em caso de contaminações nos tubos com meio de cultura. Os tubos foram incubados a 37°C e monitorados semanalmente, durante 18 semanas, para a verificação de crescimento de Map ou eventuais contaminações.

Processamento das amostras de leite

O processamento das amostras de leite das cabras seguiu a metodologia descrita por Pillai & Jayarao (2002). Foram centrifugados 40 mL de leite a 1950 x g, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, ao sedimento, foram adicionados 200 µL de tampão salina fosfato (PBS), pH 7,2. Em seguida, a suspensão foi dividida em duas partes: a primeira para extração de DNA e a segunda para cultivo de MAP.

A primeira parte da suspensão foi novamente centrifugada a 1950 x g, por 5 minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com 1 mL de PBS pH 7,2 centrifugados e a 1950 x g, por 5 minutos em cada lavagem. Em seguida, o sedimento foi ressuscitado em tubos de polipropileno de 1,5 mL previamente autoclavados, contendo 250 µL de PBS, pH 7,2 e os tubos foram armazenados a 8°C e reservados para o teste molecular.

À segunda parte da suspensão, foram adicionados 15 mL de HPC 0,75% em tubos de polipropileno de 50 mL e deixados por 5 horas à temperatura

ambiente. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 1800 x g, por 15 minutos, à temperatura ambiente e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de solução antimicrobiana contendo ácido nalidíxico (50 mg/L), cloridrato de vancomicina (50 mg/L) e anfotericina B (150 mg/L). Desta suspensão, 150 µL foram inoculados em quatro tubos contendo meio HEYM inclinado, dois deles com Micobactina J e dois sem o sideróforo. O restante da suspensão das amostras de leite foi submetido ao mesmo procedimento descrito no processamento das amostras de fezes. Os tubos foram incubados a 37°C e monitorados semanalmente, durante 18 semanas, para a verificação de crescimento de Map ou eventuais contaminações.

4.5 Análise molecular

Reação da polimerase em cadeia (PCR) convencional – IS900

As amostras de leite e as colônias suspeitas (de tubos contendo amostras de fezes ou leite) foram submetidas à extração de DNA através do *kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, EUA) e o protocolo seguiu as recomendações do fabricante, com o armazenamento do DNA a -20°C para posterior utilização. Para a realização dos testes de PCR foi utilizado o *kit Taq® Green Master Mix* (Promega), segundo o manual de instruções do fabricante. Foram realizadas reações de PCR convencional utilizando um conjunto de oligonucleotídeos: BN1 (5'-GTTATTAACGACGACGCGGAGC-3') e BN2 (5'-ACGATGCTGTGTTGGGCGTTAG-3'), com base na sequência de inserção IS900 (Sivakumar *et al.*, 2005) (Tabela 3). Esta metodologia foi padronizada anteriormente no Laboratório de Doenças Bacterianas (Ldbac) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), por Carvalho *et al.* (2009).

Quadro 3: Etapas da reação de PCR para a detecção de IS900 em amostras de leite e nos isolados suspeitos.

Referência	Desnaturação inicial	Número de	Ciclo	Extensão final	Fragmento
------------	----------------------	-----------	-------	----------------	-----------

		ciclos			
Sivakumar et al. (2005)	94°C/ 4 min	30	94°C/1min; 60°C/1min; 72°C/1min	72°C/4min	626 pb

Após na amplificação no termociclador (NYXTechnic), os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, executada a 100 volts por 45 minutos. Após a corrida, o gel de agarose foi corado em banho de Gel Red por 30 minutos. Os amplicons foram visualizados no transiluminador.

As amostras consideradas positivas foram sequenciadas no Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro/MG) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Para tal, foi utilizado o método de Sanger no equipamento 3500 (*Life Technologies*). Após a montagem dos *contigs*, as sequências foram submetidas ao Blast (*Basic Local Alignment Search Tool* – disponível em blast.ncbi.nlm.nih.gov) para verificação de identidade.

Reação da polimerase em cadeia convencional – IS1311

As amostras positivas na PCR convencional (IS900) foram submetidas à PCR convencional para detecção de IS1311 e posterior análise de restrição enzimática (REA), que foi realizada no Lanagro/MG.

Para a PCR, foi utilizado o *kit Taq® Green Master Mix* (Promega), segundo o manual de instruções do fabricante. Os *primers* utilizados foram M56 (5'-GCGTGAGGCTCTGTGGTGAA-3') e M119 (5'-ATGACGACCGCTTGGGAGAC-3'), e detectavam IS1311 (Tabela 4).

A eletroforese posterior à amplificação no termociclador (NYXTecnic) foi realizada em gel de agarose 2%, a 90 volts por 120 minutos, sendo posteriormente corado por 30 minutos em banho de Gel Red. Os amplicons foram visualizados no transiluminador.

Quadro 4: Etapas da PCR para detecção de IS1311 nos isolados de Map.

Referência	Desnaturação inicial	Número de ciclos	Ciclo	Extensão final	Fragmento
Whittington	94°C/2 min	37	94°C/30seg;	72°C/5 min	608 pb

et al. (1998)			62°C/15seg; 72°C/1 min		
---------------	--	--	---------------------------	--	--

As amostras consideradas positivas foram sequenciadas no Lanagro/MG. Para tal, foi utilizado o método de Sanger no equipamento 3500 (*Life Technologies*). Após a montagem dos *contigs*, as sequências foram submetidas ao Blast (*Basic Local Alignment Search Tool* – disponível em blast.ncbi.nlm.nih.gov) para verificação de identidade.

Análise de restrição enzimática (REA)

A análise de restrição enzimática foi realizada segundo Whittington et al. (1998) e Marsh et al. (1999). Essa etapa foi realizada no Lanagro/MG. Foram utilizadas as enzimas *Hinfl* (Promega) e *Msel* (NEB).

A reação de restrição enzimática foi incubada em banho-maria a 37°C por duas horas e, em seguida, submetida à eletroforese em gel de agarose 2%, a 90 volts por 90 minutos. Após a corrida, o gel de agarose foi corado em banho de Gel Red por 30 minutos. A interpretação dos resultados seguiu a tabela 5 e a figura 6.

Quadro 5: Produtos gerados pela restrição enzimática com as enzimas *Msel* e *Hinfl* (Whittington et al., 1998).

Espécies	Produtos (pb)
Map <i>sheep</i> (S)	285, 323
Map <i>cattle</i> (C)	67, 218, 285, 323
Map <i>bison</i> (B)	67, 218, 323
<i>M. avium</i>	134, 189, 235

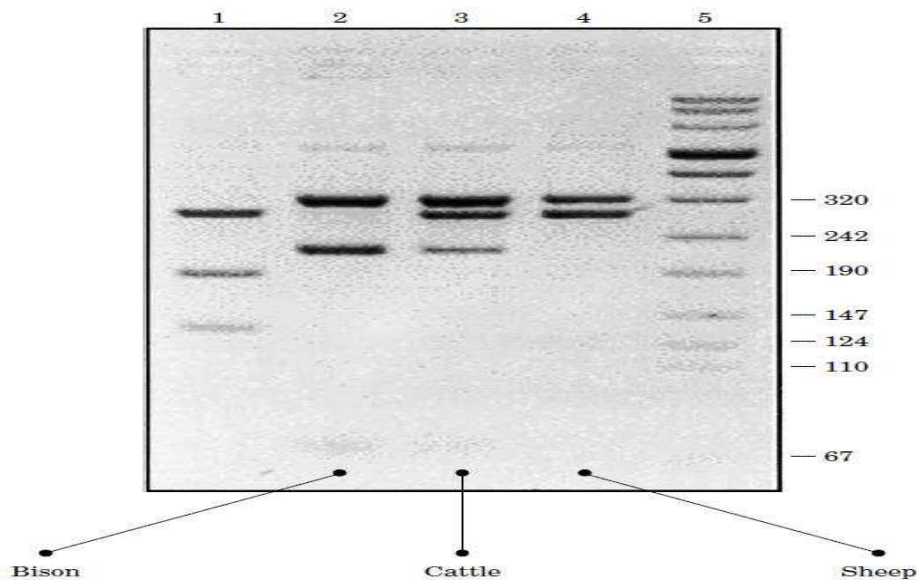


Figura 6: Resultados típicos de análise de restrição enzimática com as enzimas *MseI* e *HinfI* do produto da PCR com IS1311 com *M. avium* subsp. *avium* (coluna 1) e Map tipo B-*bison* (coluna 2), C-*cattle* (coluna 3) e S-*sheep* (coluna 4) (Fonte: Whittington et al., 2001).

5. Resultados e Discussão

Foram amostradas dez propriedades na Zona da Mata de Minas Gerais, sendo uma propriedade na microrregião de Viçosa, duas na de Manhuaçu, duas na de Muriaé, três na de Juiz de Fora, uma na de Cataguases e uma na de Ubá, atendendo à proporção citada na tabela 6, totalizando 467 animais selecionados, conforme a tabela 7. O contato com os produtores, as visitas às propriedades e a coleta das amostras ocorreram entre agosto de 2013 e julho de 2014.

Tabela 1: Distribuição das propriedades produtoras de leite de cabra nas microrregiões da Zona da Mata de Minas Gerais.

Microrregiões	Número de propriedades	Porcentagem
Cataguases	6	14,63%
Juiz de Fora	13	31,71%
Manhuaçu	8	19,51%
Muriaé	9	21,95%
Ponte Nova	1	2,40%
Ubá	2	4,88%
Viçosa	2	4,88%
TOTAL	41	100%

Tabela 2: Quantidade de propriedades e animais selecionados, por microrregião da Zona da Mata de Minas Gerais.

Microrregião	Número de propriedades selecionadas	Número de animais selecionados
Viçosa	01	90
Ubá	01	32
Juiz de Fora	03	174
Manhuaçu	02	82
Muriaé	02	76
Cataguases	01	13
TOTAL	10	467

5.1 Análise descritiva das propriedades

Os entrevistados eram proprietários (70%), arrendatários (20%) ou funcionários (10%) da propriedade (Figura 7), e tinham, em média, 42 anos, sendo todos do sexo masculino. Na implantação de programas de desenvolvimento, a faixa etária do público com o qual irá se trabalhar torna-se um fator importante, uma vez que no geral, os jovens demonstram maior adaptabilidade às mudanças (Guimarães, 2006). No Brasil, o produtor está em regime de propriedade e arrendamento em relação à terra em 73,43% e 3,16% dos estabelecimentos criadores de caprinos e ovinos, respectivamente (IBGE, 2006). Em média, os entrevistados trabalhavam com a espécie caprina há 12,9 anos, sendo que 40% há menos de 10 anos.

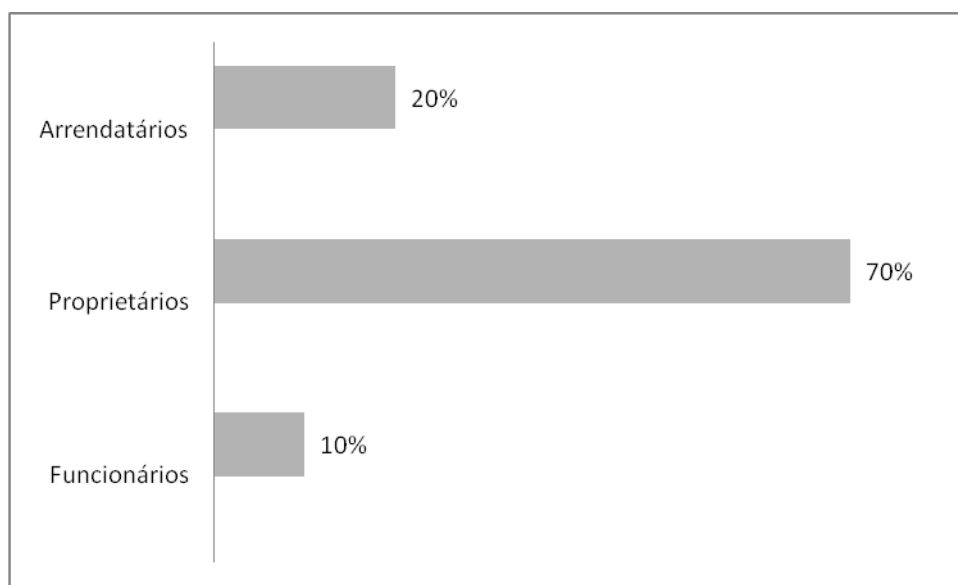


Figura 7: Regime ao qual os entrevistados estavam inseridos, em relação aos estabelecimentos produtores de leite de cabra amostrados.

Todos os entrevistados tinham pelo menos ensino fundamental completo e 40% iniciaram seus estudos no ensino superior, tendo sido concluído por 30%. Estes dados revelam a relativa educação formal dos responsáveis pelo manejo dos animais (Figura 8).

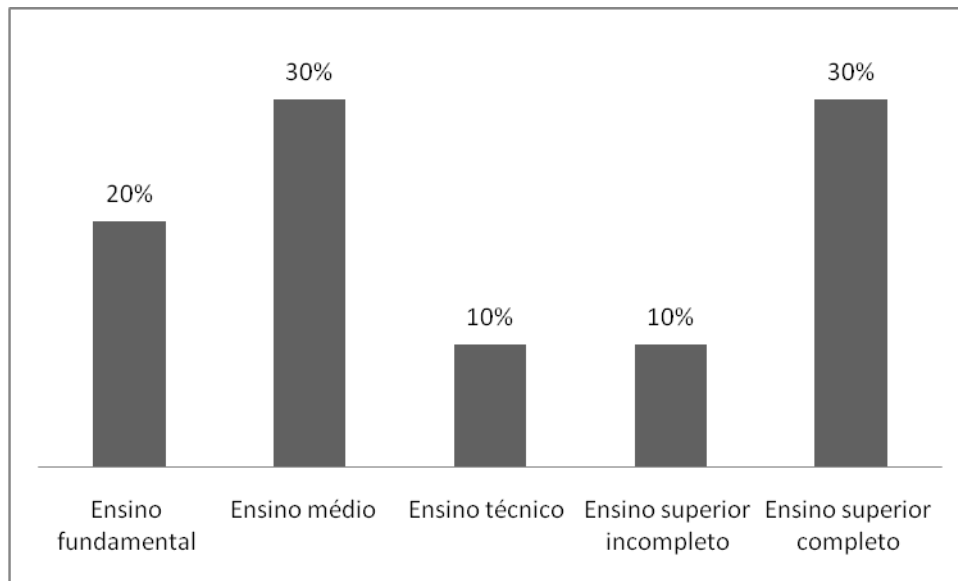


Figura 8: Escolaridade dos produtores de leite de cabra da Zona da Mata de Minas Gerais entrevistados neste estudo.

A caprinocultura foi considerada atividade principal pela metade dos entrevistados. Outras atividades concomitantes observadas eram a produção de cachaça, de café e de leite de vaca. Este dado revela a expansão da caprinocultura leiteira na Zona da Mata de Minas Gerais, visto que muitos proprietários têm como principal ou única fonte de renda esta atividade.

Neste estudo, houve predominância de pequenas propriedades: 80% tinham menos de 100 hectares (em média, 10,03 hectares). Estes dados são compatíveis com os dos Censos Agropecuários de 1996 e 2006, nos quais 56% e 81% das propriedades tinham menos de 100 hectares, respectivamente (IBGE, 1996; IBGE, 2006). Em cinco estabelecimentos visitados, menos de 20% da sua área total era utilizada com caprinos; em três era utilizado mais de 45% e dois entrevistados não souberam responder (Figura 9). Havia fornecimento de energia elétrica em todas as propriedades.

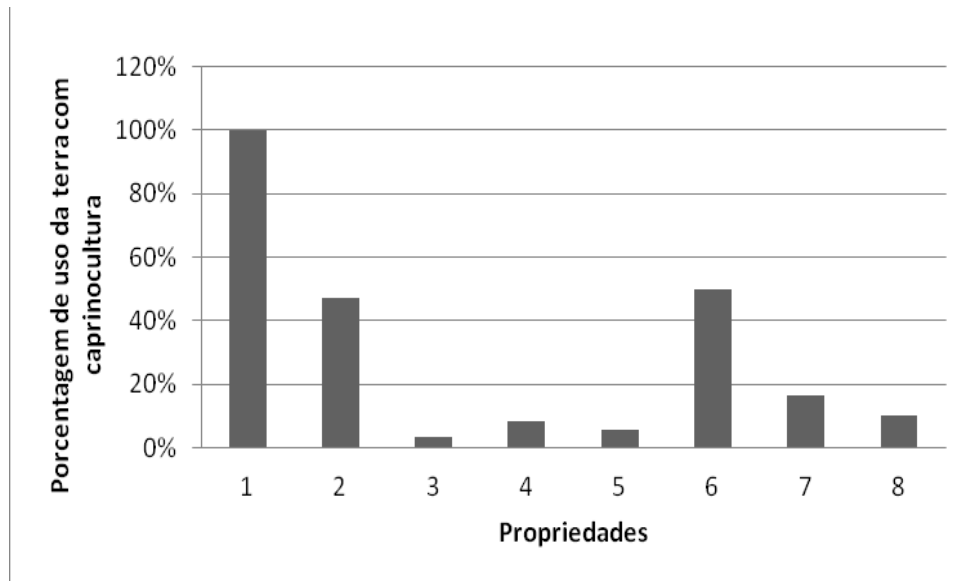


Figura 9: Porcentagem de uso da terra com caprinocultura em oito propriedades visitadas na Zona da Mata de Minas Gerais.

A caprinocultura leiteira foi considerada rentável por 70% dos entrevistados. Dois produtores que a consideraram não rentável ainda estavam em fase de investimentos em infraestrutura e/ou compra de animais e uma propriedade produzia leite de cabra sem fins lucrativos, apenas de reposição de gastos. O leite é uma atividade com pouca margem de lucro por litro; portanto, é imprescindível o volume de produção. Até o presente momento, poucos estudos de viabilidade econômica de sistemas de produção de leite de cabra foram conduzidos (Silva et al., 2012).

Todas as criações amostradas criavam cabras objetivando a produção de leite, e faziam uso do regime de confinamento. Segundo Borges (2003), no sistema intensivo confinado, é essencial a alimentação volumosa e concentrada de alta qualidade o ano todo, ampliando a complexidade do sistema. Um aspecto importante é que o conhecimento tecnológico para eficiência do sistema confinado também deve ser maior, devido aos animais serem levados ao limite do seu potencial de produção, almejando o aumento da produtividade. O sistema requer mão-de-obra qualificada para atender às exigências de manejo nutricional, reprodutivo e sanitário de um rebanho especializado.

Gouveia et al. (2009) estudaram a caprinocultura leiteira no estado de Minas Gerais. Das 84 propriedades amostradas, 83 (99,0%) criavam caprinos

para produção de leite em regime intensivo. Magalhães et al. (1985), em levantamento realizado em Rio de Janeiro e em Minas Gerais, encontraram 54,2% dos criatórios com caprinos em regime intensivo e 45,8% em regime semi-intensivo. O aumento do percentual de propriedades com regimes intensivos se deu em função da maior facilidade de controle das endoparasitoses e maior produtividade (Gouveia et al., 2009).

Havia pelo menos um empregado em 60% das propriedades, o que demonstra a capacidade de geração de empregos da caprinocultura leiteira na Zona da Mata. Entretanto, a mão-de-obra familiar ainda estava presente em propriedades com menor produção de leite e/ou que haviam iniciado suas atividades há pouco tempo. Em média, havia 4,17 empregados nas propriedades. Entretanto, a mediana foi de 2,5 empregados, em uma distribuição modal (moda = 2). A diferença entre os dois valores deve-se ao fato de que em uma propriedade havia 13 (treze) empregados, e nas demais havia apenas dois ou três. A utilização de mão-de-obra eficiente é uma questão importante quando se considera o custo de produção do leite produzido em confinamento, estando atrás somente dos custos com alimentação (Borges, 2003).

Todos os entrevistados vendiam o leite para consumo, e o preço médio foi de R\$ 1,67 por litro, sendo que 60% o vendiam por R\$ 1,70, valor acima das médias nacional (R\$ 1,22), regional (R\$ 1,67) e estadual (R\$ 1,40) (IBGE, 2006). Entretanto, como o Censo Agropecuário é realizado de dez em dez anos no Brasil, esta diferença pode ter ocorrido devido à inflação.

Havia entre 47 e 550 animais em cada propriedade, com média de 165 e mediana de 134,5 animais. De acordo com o Censo Agropecuário de 2006 (IBGE, 2006), existem, em média, 15,66 animais em cada estabelecimento criador de caprinos da região Sudeste. Entretanto, neste estudo a média foi superior, pois foram considerados apenas rebanhos de produção comercial, e no Censo são considerados todos os estabelecimentos que criam caprinos, com ou sem fins de produção e/ou comércio.

A escolha da raça a ser explorada deve considerar o objetivo da criação, o ambiente, o sistema de manejo e a produção a ser obtida (Borges & Gonçalves, 2002). Como é visto na Figura 10, a principal raça explorada foi Saanen (Figura 11), em nove (90%) propriedades, sendo que em três destas

também havia animais da raça Parda Alpina (Figura 12). Uma (10%) propriedade explorava exclusivamente animais pardos. Ambas as raças possuem aptidão leiteira, sendo a Saanen, apontada como a raça de maior produção leiteira, de origem suíça e a Parda Alpina de origem dos Alpes franceses e suíços (Borges & Gonçalves, 2002). Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, predominam as raças exóticas de origem europeia: Saanen, Parda Alpina, Toggenburg e Anglo Nubiana, especializadas para a produção de leite, e animais oriundos de cruzamento dessas raças. Embora presente há algumas décadas, pouco se conhece sobre o desempenho dessas raças e são escassas as estimativas de parâmetros genéticos das características produtivas no Brasil com um número consistente de observações (Gonçalves et al., 2001).

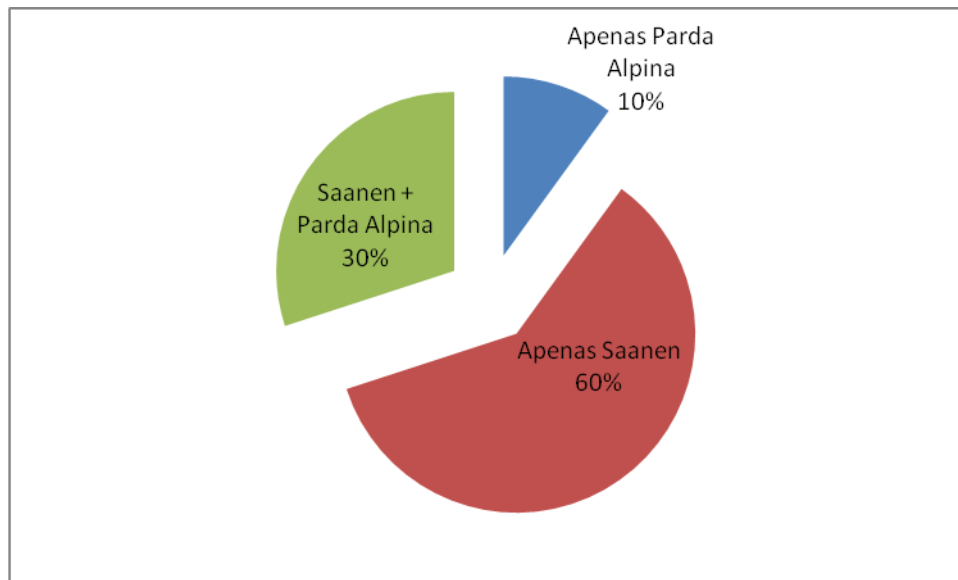


Figura 10: Distribuição das raças exploradas nas propriedades produtoras de leite de cabra da mesoregião da Zona da Mata de Minas Gerais.

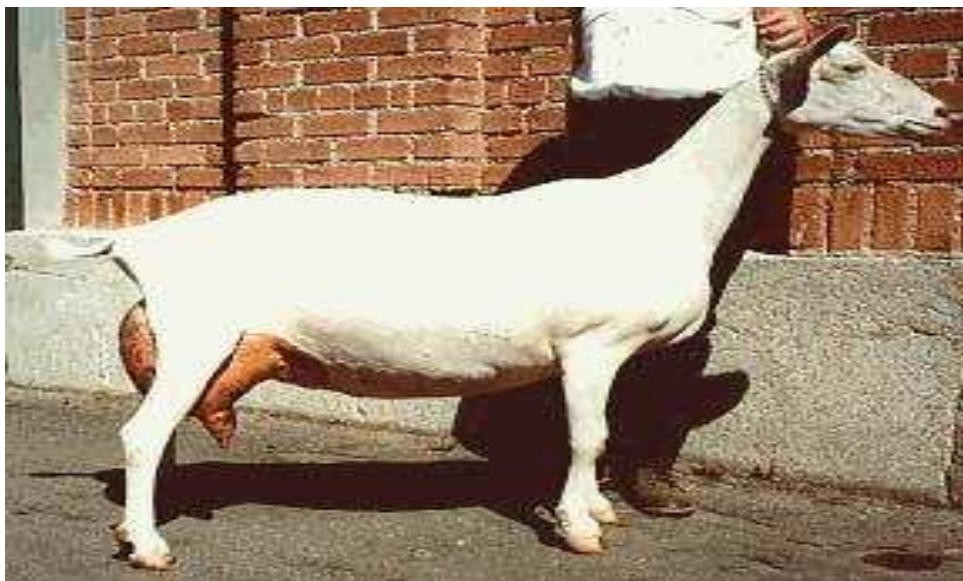


Figura 11: Exemplo de animal da raça Saanen, de aptidão leiteira. Fonte: Capritec (Disponível em: <http://www.capritec.com.br/csa/Rebanho/Saanen/Reb-Saa.htm#Características>. Acesso em: 07/10/2014 às 08h24min.)



Figura 12: Animal da raça Parda Alpina, de aptidão leiteira (Fonte: <http://www.brasilfarmavet.com.br/products/parda-alpina/>. Acesso em 07/10/14, às 08h39min).

Havia, em média, 60,4 cabras em lactação em cada propriedade. A mediana deste dado foi de 54,5 animais em lactação. A média geral de produção de leite foi de 140,25 litros por dia e 2,55 litros por animal por dia. A produção leiteira pode ser influenciada pela duração da lactação, ano e

estação do parto, idade do animal ao parto, sistema de alimentação, o estado sanitário dos animais, entre outros fatores (Cabrita, 2013).

Nas propriedades que exploravam apenas cabras da raça Saanen, a média foi de 2,73 litros por animal por dia, e nas propriedades que exploravam as duas raças a média foi de 2,27 litros por animal por dia. Somente uma propriedade explorava apenas a raça Parda Alpina, com média de produção de 2,3 litros por animal por dia. A diferença nestes valores pode ser devido a diversos fatores, como manejo e ambiente, mas também há influência genética da raça e esses dados confirmam a raça Saanen como grande produtora de leite.

Todas as propriedades submetiam os animais a duas ordenhas diárias. O período médio de lactação das cabras foi de 282,5 dias, sendo que 70% das propriedades mantinham os animais em produção por pelo menos 300 dias.

Os animais em lactação ficavam em instalações de piso ripado suspenso em 70% dos estabelecimentos produtores, e 30% fazia o uso da cama de serragem (20%) ou de bagaço de cana-de-açúcar (10%). A principal vantagem do uso de piso suspenso é o fato dos animais ficarem afastados da umidade, sendo uma alternativa viável em regiões muito úmidas ou onde seja difícil a aquisição de material para a cama (Borges & Bresslau, 2002). As instalações com piso de cama demandam menores investimentos na sua implementação, entretanto, quanto ao aspecto sanitário, Costa & Vieira (1987) não observaram redução na carga de parasitos entre os caprinos mantidos nos dois tipos de instalação. Cordeiro et al. (2001) avaliaram a influência do tipo de piso sobre a saúde da glândula mamária de caprinos leiteiros e observaram contagens de células somáticas significativamente menores em cabras mantidas em cama quando comparadas àquelas mantidas em piso ripado suspenso.

Os animais eram identificados individualmente em nove (90%) propriedades, de diversas maneiras: apenas com coleiras (44%), apenas com brincos (11%), apenas com tatuagem (22%) ou com tatuagem e coleira (22%). A identificação individual dos animais é importante para o controle zootécnico e sanitário, pois desse modo é possível ter o histórico de doenças de cada animal e o seu desempenho produtivo e reprodutivo. Gouveia et al. (2009) encontraram 74% dos criatórios leiteiros com uso de identificação individual,

diferente de Guimarães (2006), que encontrou apenas 7,5% de uso dessa ferramenta em criatórios de corte.

A taxa de mortalidade anual entre os animais adultos variou bastante, como é visto na Figura 13. Um dado importante é que 30% das propriedades perdiam pelo menos 5% dos seus animais adultos ao ano. Esse valor pode ser devido a erros de manejo no que se refere ao controle e prevenção de doenças.

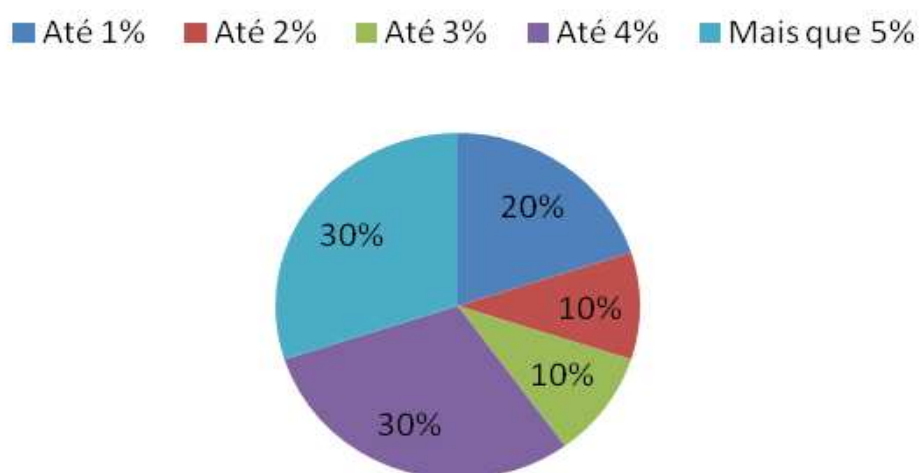


Figura 13: Mortalidade de animais adultos das propriedades produtoras de leite de cabra na mesorregião da Zona da Mata de Minas Gerais.

Quatro (40%) propriedades realizavam ordenha manual e, destas, uma não fazia uso da sala de ordenha. Todas as propriedades que realizavam ordenha mecânica mantinham uma rotina de higiene com pré e pós-*dipping*. O pré-*dipping* é uma importante ferramenta para reduzir a contaminação da pele dos tetos, ficando evidente o potencial risco à contaminação do leite quando não praticado (Miguel et al., 2012). Duas propriedades que realizavam ordenha manual não realizavam a higiene através do uso das soluções de pré e pós-*dipping*. Uma delas apenas desprezava os três primeiros jatos de leite, e a outra propriedade limpava os tetos com uma flanela imersa em solução de cloro, comum a todos os animais.

A água de consumo dos animais era do sistema público de abastecimento em 20% das propriedades. As fontes alternativas (80%) consistiam em mina (20%), poço artesiano (30%), poço semi-artesiano (20%) e

nascente (10%). A baixa frequência de água tratada nos estabelecimentos pode ser considerada um risco aos animais, pois a água pode ser um veículo de transmissão de Map e de outros agentes patogênicos (Radostits et al., 2002).

A limpeza dos bebedouros era realizada em todas as propriedades, com frequências variadas, conforme a Figura 14. Esta limpeza tem importância significativa na prevenção de doenças, pois ao haver o acúmulo de sujidades e de micro-organismos, esses podem formar biofilmes, o que pode dificultar a sua retirada posterior por simples remoção mecânica. Map é capaz de formar biofilmes rapidamente em bebedouros de animais, o que exerce papel crucial na patogenicidade dessa bactéria e a torna mais resistente ao estresse químico, favorecendo sua sobrevivência no ambiente (Singh et al., 2013).

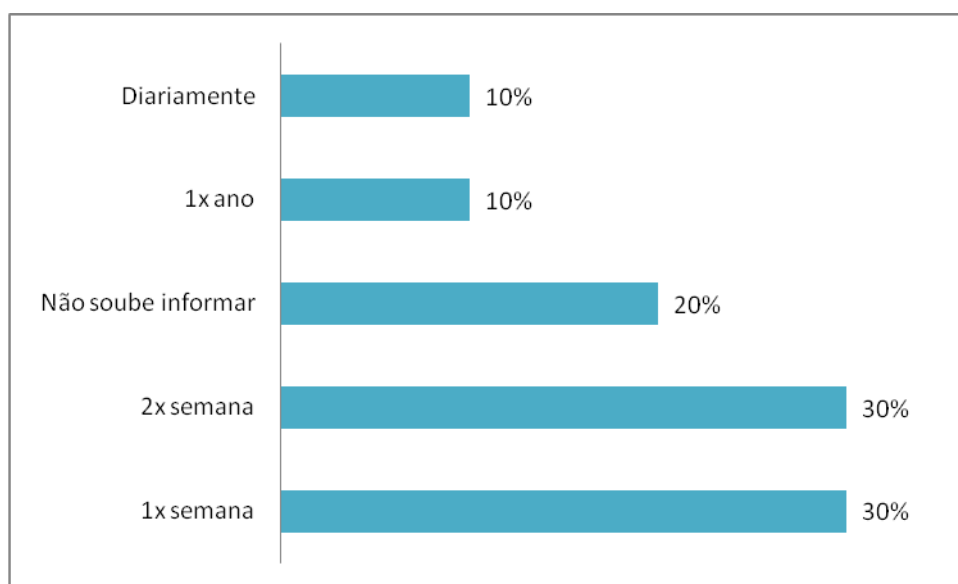


Figura 14: Frequência de limpeza dos bebedouros nas propriedades produtoras de leite de cabra na mesorregião da Zona da Mata de Minas Gerais.

Apenas um (10%) estabelecimento contava com a assistência veterinária, semanalmente. Na Zona da Mata de Minas Gerais, não há muitos médicos veterinários especializados em caprinos, o que leva os produtores a procurá-los apenas quando o rebanho enfrenta alguma situação mais grave. Um estudo realizado por Freitas et al. (2015) revelou que, na região semi-árida do país, 93% dos produtores de leite de cabra não contam com assistência veterinária. A falta de assistência é um fator crítico da produção, pois leva a

possíveis erros de manejo, principalmente no que se refere à prevenção, controle e tratamento de doenças. Produtores que não possuem assistência técnica compõem o grupo de maior risco, pelos menores critérios sanitários a que são submetidos, e apresentam maior sujeição aos processos de disseminação de agentes patogênicos (Guimarães, 2006).

O dado acima é compatível e agravado pelo fato de que 60% dos entrevistados não realizavam vacinação dos animais. Aqueles que a realizavam, vacinavam contra apenas clostridioses (10%), clostridioses e raiva (20%) ou clostridioses, raiva e leptospirose (10%). As doenças causadas por bactérias do gênero *Clostridium* são infecções ou intoxicações frequentemente fatais e apresentam alto risco para as criações de caprinos, devido às grandes perdas econômicas e dos problemas de ordem sanitária que acarretam (Veschi et al., 2010).

Quando perguntados sobre as principais doenças que acometem o seu rebanho, 30% dos entrevistados responderam que a mastite é considerada um problema sanitário e econômico. Considerando-se que o preenchimento de todos os critérios desejáveis de qualidade depende de um programa de saúde para o rebanho, baseado principalmente em medidas de prevenção e adoção de práticas de higiene adequadas, a mastite é considerada uma enfermidade de grande importância nos sistemas de exploração pecuária, sobretudo devido aos prejuízos causados pela redução na produção e pela baixa qualidade do leite produzido (Souza et al., 2014). A linfadenite caseosa foi considerada um problema em 70% das propriedades. Essa doença é causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, e causa grandes prejuízos à caprinovinocultura brasileira (Carminati et al., 2003). De acordo com Alves & Olander (1999), a desvalorização da pele chega a 40%, ocorre significativa diminuição na produção de leite, além do aumento de custo de produção pela exigência do uso de medicamentos e de mão-de-obra para tratamento dos granulomas superficiais.

A área de isolamento para animais doentes estava ausente em 30% dos estabelecimentos, o que pode favorecer a transmissão de agentes entre animais doentes e sadios. Freitas et al. (2015) encontraram 58% de ausência desse tipo de manejo na região semi-árida do Brasil. Os destinos dos esterco foram a capineira (60%) e a lavoura (40%), e os animais mortos eram

enterrados em todas as propriedades. O costume de enterrar as carcaças, além do custo, tem como objeção a possibilidade da contaminação do lençol freático. A compostagem é um método econômico e ambientalmente correto de destino dos animais mortos por permitir a reciclagem desses resíduos orgânicos, exigindo menor uso de mão de obra, quando comparado a alguns dos outros métodos, embora necessite de critérios rígidos para sua execução, mas é uma alternativa viável para o criador. Conduzida corretamente, a compostagem não causa poluição, evita a formação de odores, destrói agentes patogênicos e fornece como produto final um composto orgânico que pode ser utilizado no solo (Embrapa).

Apenas um (10%) entrevistado relatou não ter o hábito de consumir o leite produzido em sua propriedade. Entre aqueles que o consumiam, 88,89% realizavam a fervura antes do consumo. Este dado revela um risco ao qual os consumidores estão submetidos, quando consomem leite de cabra sem um tratamento térmico prévio. Além disso, há relatos de micro-organismos resistentes ao processo de pasteurização. No caso específico da paratuberculose, alguns estudos (Shankar et al., 2010; Carvalho et al. 2012) recuperaram cepas viáveis de Map de leite de vaca pasteurizado.

O consumo de leite de cabra em países em desenvolvimento é bastante diverso e determinado por situações culturais e condições econômicas e está relacionado aos padrões de vida, mas geralmente é baixo. A maior parte do leite de cabra produzido é auto-consumido ou vendido localmente através do comércio informal. É difícil estabelecer a quantidade de leite produzida e auto-consumida ou vendida no mercado local devido à falta de dados estatísticos mundiais sobre o leite de cabra (Dubeuf, 2010).

Apenas um (10%) entrevistado relatou não ter o hábito de realizar a cura do umbigo dos animais recém-nascidos. Entre aqueles que a realizavam, todos a faziam com solução de iodo a 10%. Esta prática é de suma importância, visto que evita a entrada de micro-organismos patogênicos no corpo do animal neonato. No caso da paratuberculose, os animais são mais suscetíveis à infecção nos primeiros meses de vida. Ruminantes adultos são mais difíceis de serem infectados, pois desenvolve resistência associada à idade (Kennedy & Benedictus, 2001). Portanto, essa prática pode evitar que o contato do corpo do

recém-nascido com fezes e com o solo contaminados leve à introdução de Map no seu organismo.

A limpeza e a desinfecção das instalações ocorriam em frequências variadas: a cada 60 dias (40%), uma (10%) ou duas (20%) vezes ao ano, duas vezes ao mês (10%) ou uma vez na semana (10%). Um entrevistado não soube responder. O método de desinfecção mais utilizado foi o uso de vassoura de fogo e cal (60%). Outros métodos utilizados foram apenas cal (10%), apenas vassoura de fogo (20%) e cal e solução de amônia quartenária (10%). A periodicidade com que devem ser feitas a limpeza e a desinfecção depende do número de animais, das condições ambientais, do tipo de piso, do sistema de exploração e do tipo de instalações utilizadas na propriedade. A limpeza é fundamental para a retirada de matéria orgânica e micro-organismos, o que possibilita melhor ação das soluções desinfetantes.

Havia, em todas as propriedades, outras espécies animais em contato direto e/ou indireto com os caprinos em produção. A espécie mais prevalente foram os cães (80%), seguida dos equinos e gatos (70%). (Figura 15). Esse contato entre as espécies favorece a disseminação de agentes patogênicos e aumenta o risco de os animais desenvolverem determinadas doenças comuns a essas espécies.

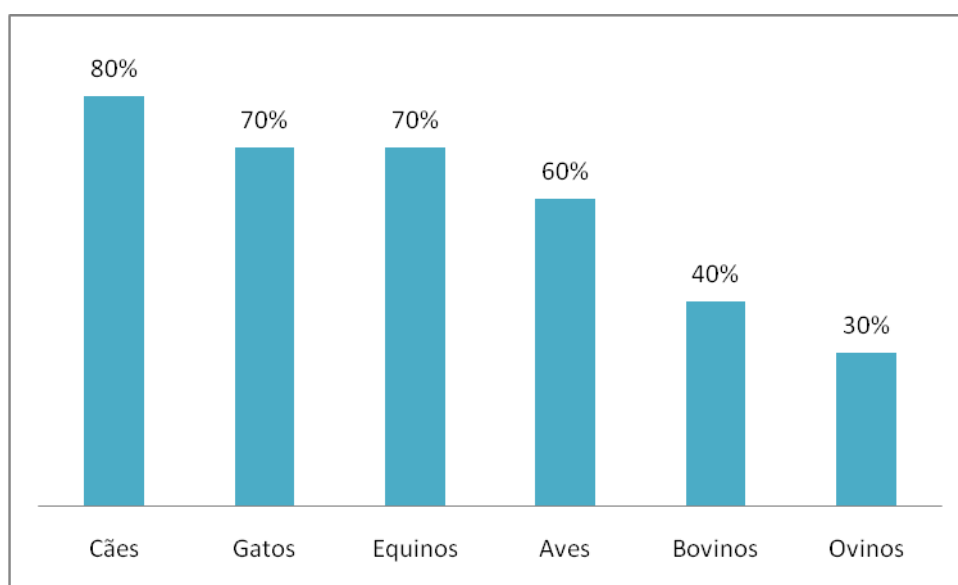


Figura 15: Porcentagem de presença de outras espécies nas propriedades de caprinos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais.

Quanto à alimentação dos animais, 90% dos entrevistados produziam e compravam os alimentos. Apenas um (10%) relatou não ter o hábito de comprá-los, apenas produzi-los, mesmo em épocas de seca. Nessas épocas, é necessário ter mais atenção quanto à alimentação, devido à escassez de determinadas culturas. A produção de leite vinculada à produção de volumosos de boa qualidade minimiza a necessidade de compra, o que diminui o custo alimentar por litro de leite produzido (Borges, 2003). A produção e a qualidade do leite de cabra estão diretamente relacionadas ao tipo e à qualidade da dieta dos animais, além de outros fatores, como a raça, o período de lactação, o clima e a combinação destes com outros fatores. O manejo alimentar é determinante na produção e composição do leite e relaciona-se à quantidade e qualidade da dieta (Zambom et al., 2005).

Todos os entrevistados realizavam o aleitamento artificial dos animais recém-nascidos, com leite de cabra (40%), de vaca (40%), leite em pó das duas espécies (10%) ou sucedâneo (10%). Quanto ao tratamento prévio, 20% dos entrevistados pasteurizavam o leite, 10% realizavam a fervura e 10% o deixavam em banho-maria a 56°C por uma hora. Entretanto, seis (60%) participantes relataram não realizar nenhum tipo de tratamento térmico. Este dado é importante, considerando-se a sanidade dos filhotes, pois o leite é uma via importante de transmissão de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e micro-organismos patogênicos (Freitas et al., 2015).

O intervalo entre partos (IP) foi de 12 meses em 70% das propriedades, e inferior a 12 meses em 30%; e é definido como o período compreendido entre duas partições, sendo considerado um dos melhores parâmetros para medir a eficiência reprodutiva de um rebanho (Terril & Foote, 1987). No Brasil, estudos com a espécie caprina demonstram que o IP é alto em raças especializadas, devido ao efeito da estacionalidade reprodutiva nesses animais, enquanto que, para os caprinos nativos de regiões tropicais, onde a influência da sazonalidade é baixa, observam-se intervalos com melhores índices (Gonçalves et al., 1997). O IP é uma característica que pode interferir diretamente na rentabilidade de uma exploração. Além disso, limita a intensidade de seleção, uma vez que o prolongamento do IP diminui o número de cabritos desmamados e aumenta o intervalo de gerações (Gonçalves et al., 2002).

Todos os entrevistados relataram utilizar como sistema de reprodução a monta controlada, e 50% destes também realizava a inseminação artificial. A origem do reprodutor era de outra propriedade (70%), dela mesma (10%) ou havia reprodutores de origens distintas (20%). A introdução de animais de outros rebanhos sem a realização prévia de testes diagnósticos é um fator que pode contribuir para a introdução e disseminação de patógenos, como Map, no rebanho. O único método que consegue garantir que um animal infectado não será introduzido em um rebanho livre da doença é a manutenção do rebanho fechado (Lilenbaum et al., 2007).

Com esse estudo, foi possível analisar e caracterizar os diferentes modos de produção de leite de cabra empregados na Zona da Mata de Minas Gerais. Os produtores têm relativa instrução, mas ainda convivem com a baixa produtividade e o baixo rendimento da sua produção, o que leva a maioria a necessitar de outras fontes de renda. O incentivo governamental exerce papel fundamental na mudança do cenário atual da caprinocultura leiteira dessa mesorregião.

O desenvolvimento de sistemas de produção de leite de cabra está relacionado ao planejamento regional e local. Os caprinos têm o potencial de usar terras marginais, mas requer investimentos em infraestrutura e treinamento. Entretanto, os produtos derivados de cabra competirão com outros produtos por um espaço no mercado de acordo com as potencialidades locais. O crescente interesse em produtos lácteos de caprinos no mundo inteiro significa que a situação favorável atual terá que ser consolidada para explorar o comportamento do consumidor e todas as oportunidades potenciais do mercado (Dubeuf, 2010).

5.2 Detecção de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Onze (2,36%) animais foram considerados positivos para a presença de Map, nas análises microbiológicas e moleculares, em quatro (40%) propriedades.

Para o diagnóstico de infecção por Map, a escolha do teste diagnóstico é essencial para o sucesso dos programas de controle, mas isso depende do

objetivo e deve, invariavelmente, envolver múltiplos testes nos casos de infecção crônica por Map (Barad et al., 2014).

No Brasil, dados sobre a paratuberculose em rebanhos de caprinos são escassos, o que destaca a necessidade de estudos epidemiológicos para pesquisar a prevalência da doença e identificar fatores que possam contribuir para a disseminação do agente (Freitas et al., 2015).

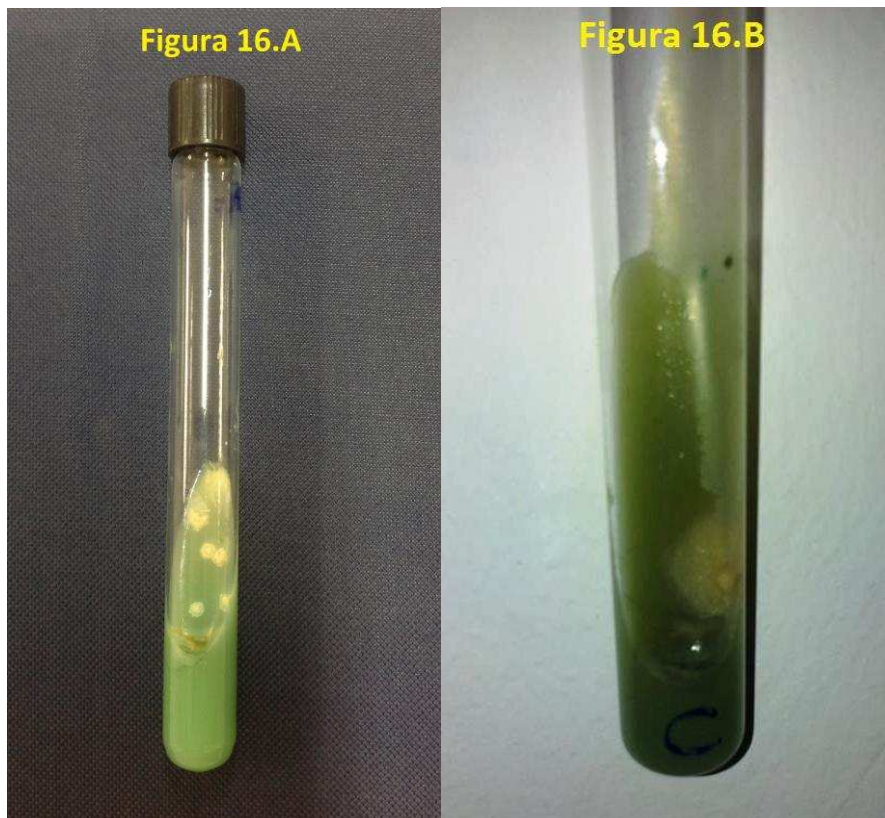
Teste microbiológico em meio HEYM

Foram cultivadas em meio HEYM 467 amostras de fezes e 464 amostras de leite. Essa diferença ocorreu devido a perdas durante o transporte das amostras.

Duas amostras de fezes (0,43%) obtiveram crescimento bacteriano característico de Map (Figuras 16.A e 16.B), pois apresentaram crescimento em 13 e 16 semanas, respectivamente, com colônias não pigmentadas e inicialmente lisas e pequenas que, posteriormente, tornaram-se maiores. Além disso, essas amostras não apresentaram crescimento em tubos sem micobactina *J*. As cepas de Map pigmentadas foram isoladas apenas em casos de paratuberculose lepromatosa ovina, nos quais o intestino aparece amarelo ou alaranjado, provavelmente devido ao grande número de organismos presentes nas lesões (Stevenson et al., 2002).

Foi realizada a extração de DNA destas colônias e realizada a PCR convencional para detecção de IS900 e o posterior sequenciamento, que confirmaram as suspeitas.

Não houve crescimento nos tubos de meio HEYM contendo amostras de leite. Considerando as dificuldades de cultivo *in vitro* de Map e o fato de que a eliminação do agente nas fezes é mais significativa que no leite (Larsen et al., 1975), esses resultados encontram-se dentro do esperado para esse tipo de patógeno.



Figuras 16.A e 16.B: Colônias típicas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em meio HEYM com micobactina, a partir de amostras fecais de cabras leiteiras da Zona da Mata de Minas Gerais.

Apenas um dos dois animais considerados positivos no crescimento *in vitro* apresentava emaciação no dia da coleta das amostras, sem relatos de sinais anteriores sugestivos de paratuberculose. As amostras de leite desses animais não apresentaram resultado positivo na PCR convencional para detecção de IS900. Tal observação é compatível com o segundo estágio da doença, no qual há eliminação do agente, principalmente nas fezes, mas o animal não apresenta sinais clínicos (Sibley, 2005). Kruze et al. (2006) relataram um caso de paratuberculose clínica em uma cabra com 12 anos de idade, que apresentava emaciação (apesar da manutenção do apetite) e pelagem seca e áspera, sem evidência de diarreia. Esse animal apresentou resultado positivo no cultivo em meio HEYM, sorologia e PCR-IS900.

Os resultados deste estudo são compatíveis com outros realizados anteriormente (Coelho et al., 2008; Dimareli-Malli et al., 2009; Medeiros et al., 2012, Barad et al., 2014), nos quais o baixo percentual de isolamento de Map confirma a baixa sensibilidade do isolamento para o diagnóstico individual da

paratuberculose. Além disso, o isolamento de Map é difícil a partir de animais subclínicos, devido à eliminação intermitente e baixo número de bactérias nas fezes e no leite (Whipple et al., 1991).

Dimareli-Malli et al., em 2013, estudaram as características fenotípicas e genotípicas de cepas de Map isoladas de pequenos ruminantes e concluíram que, para o isolamento primário de Map, o ideal é usar o meio M7H11 isoladamente ou, ainda, uma combinação dos meios M7H11 e HEYM, que aumenta o crescimento dos principais tipos de Map e reduz o período de incubação a 37°C. O fato de esse estudo ter utilizado apenas o meio HEYM pode ter limitado o crescimento de algumas cepas de Map.

Apesar de algumas desvantagens, a cultura fecal ainda é considerada o teste mais confiável para a detecção de Map em animais com infecção subclínica e permanece como o “padrão ouro” para o diagnóstico de paratuberculose (Stabel, 1997).

Teste molecular

O diagnóstico baseado na detecção de sequência específica de IS900 através da PCR é considerado um método alternativo ao cultivo, com rapidez nos resultados (Sivakumar et al., 2005).

Nove (1,94%) amostras de leite apresentaram resultados positivos na PCR convencional para detecção de IS900, confirmados pelo sequenciamento no Lanagro/MG. Além disso, como citado anteriormente, as duas amostras de fezes com crescimento característico em meio HEYM foram submetidas à PCR e ao sequenciamento, e confirmadas como Map. Todas as amostras sequenciadas apresentaram 94 a 99% de similaridade com a cepa K-10 de Map.

O leite tem sido sugerido como um possível veículo de transmissão de Map para humanos (Grant et al., 2001). Neste estudo, foi observado que 90% dos entrevistados consomem o leite produzido em seu estabelecimento, mas que a fervura ainda não é um método utilizado por todos. Esse achado representa um risco à saúde pública, considerando a possível associação entre a presença de Map e o desenvolvimento da doença de Crohn em humanos.

A prevalência de infecção por Map nos caprinos leiteiros da Zona da Mata foi de 2,36% (11/467), sendo duas amostras de fezes positivas no cultivo em meio HEYM e nove amostras de leite positivas na PCR.

Todas as amostras positivas foram submetidas à PCR para detecção de IS1311, que confirmou, mais uma vez, a identidade de Map, com posterior sequenciamento e análise de restrição enzimática com as enzimas *MseI* e *Hinfi* para caracterizar os isolados.

O local de restrição da enzima *Hinfi* diferencia entre as cepas tipo S (*sheep*) e tipo C (*cattle*) de Map (Figura 17) e o local de restrição da enzima *MseI* em *M. avium* distingue essa espécie de Map (Figura 18) (Marsh et al., 1999). Como os onze isolados testados eram de Map, a digestão com *MseI* não ocorreu, gerando produtos com 608 pb (Figura 18).

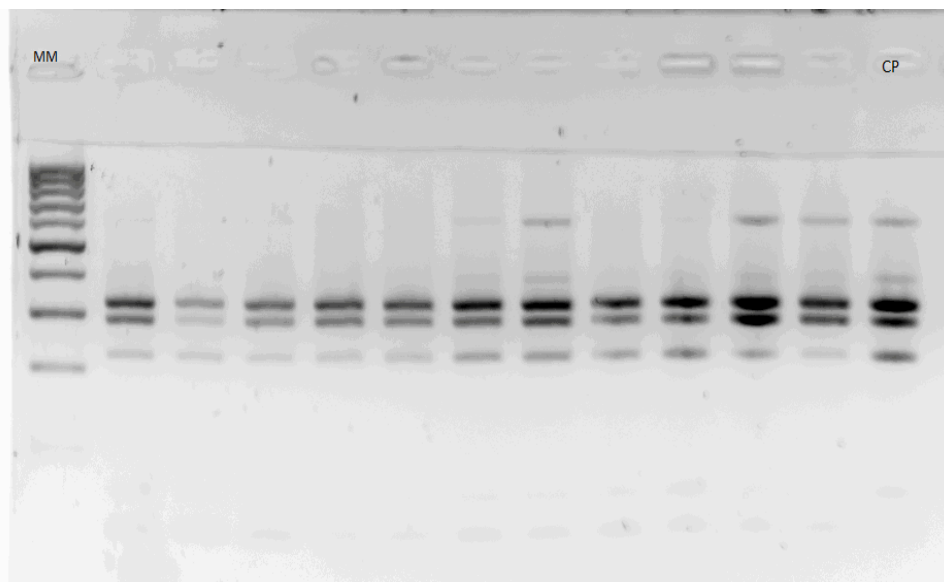


Figura 17: Análise de restrição enzimática das amostras, em gel de agarose 2%, com a enzima *Hinfi*. MM = marcador molecular de 100bp; CP = controle positivo de Map.

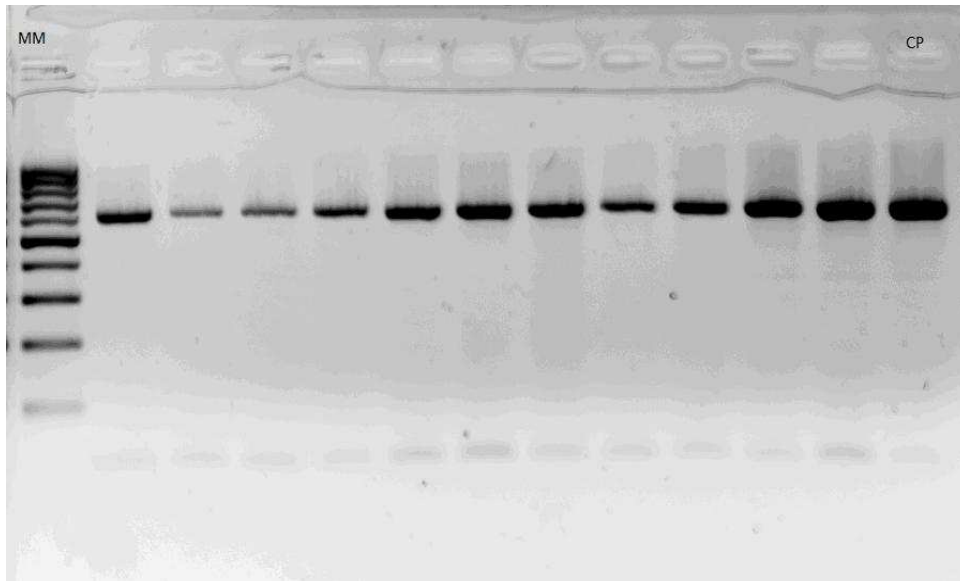


Figura 18: Análise de restrição enzimática das amostras, em gel de agarose 2%, com a enzima *MseI*. MM = marcador molecular de 100bp; CP = controle positivo de Map.

Todas as amostras foram caracterizadas como sendo do tipo C (*cattle*), com demonstração das bandas compatíveis com esse tipo de cepa (Tabela 5 e Figura 6). A análise de restrição enzimática dessas cepas confirmou a presença de polimorfismo na base de posição 223 existente nas cepas tipo C (*cattle*). Isso foi demonstrado pela presença de uma banda extra (218 pb) no seu padrão de restrição, quando comparado à cepa tipo S (*sheep*) (Figura 6). O local extra de restrição pela enzima *Hinfi* fornece, ainda, uma banda de 67 pb difícil de ser visualizada na eletroforese. A presença da banda de 218 pb é consistente com a presença do local de restrição de *Hinfi* em algumas cópias de IS1311 na cepa C (*cattle*). A banda de 285 pb no padrão de digestão da cepa C (*cattle*) também está presente no padrão da cepa S (*sheep*) (Figura 6) (Marsh et al., 1999).

Sibley (2005) caracterizou seis cepas isoladas de caprinos, sendo todas do tipo C (*cattle*). Sevilla et al. (2005) caracterizaram cepas de Map de diferentes hospedeiros, sendo 12 de caprinos, e três (25%) eram do tipo C (*cattle*). Em um estudo realizado por De Juan et al. (2006b), foram analisadas 158 cepas de Map, sendo 81 isoladas de caprinos. Dessas, 61 (75,3%) isolados foram caracterizados como Map tipo C (*cattle*). Fiorentino et al. (2012) analisaram oito cepas de Map isoladas de caprinos leiteiros da Argentina e todas eram do tipo C (*cattle*). Dimareli-Malli et al. (2013) avaliaram 52 isolados

de Map de caprinos, sendo que 41 (78,9%) eram do tipo C (*cattle*). Singh et al. (2015) analisaram 80 cepas de Map isoladas de diferentes espécies, sendo 18,75% do tipo C (*cattle*). Portanto, os achados desse estudo são compatíveis com os estudos citados anteriormente, nos quais o tipo C (*cattle*) foi o tipo mais comum isolados de caprinos. O tipo C (*cattle*) também é o tipo predominante em bovinos (Dimareli-Malli et al., 2013).

O teste de PCR associado à análise de restrição enzimática com base na IS1311 é altamente sensível e específico para diferenciar Map e *M. avium* sem a necessidade de realizar a PCR com base na IS900. Esse tipo de teste é muito útil para amostras de diferentes origens (Marsh et al., 1999).

A caprinocultura leiteira da Zona da Mata de Minas Gerais apresenta desenvolvimento crescente nos últimos anos, porém ainda sem o apoio técnico e governamental necessário. Os produtores necessitam, em muitos casos, de fontes de renda alternativas à atividade e ainda apresentam falhas de manejo que podem levar ao comprometimento da sanidade e produtividade dos animais e da qualidade do produto final.

Devido à falta de consciência sobre a paratuberculose entre os proprietários de caprinos e à falta de regulamentação sobre o comércio de animais e de padronização das práticas de criação, a disseminação de Map entre e dentro dos rebanhos caprinos deve ser esperada (Kruze et al., 2006).

As medidas de controle da disseminação desse agente na mesorregião estudada devem consistir na redução da transmissão do agente nas propriedades positivas (através da eliminação de animais positivos, melhorias nas práticas de higiene, separação do recém-nascido logo após o nascimento, entre outras) e evitar a introdução do agente nas propriedades negativas (através de aquisição de animais de propriedades controladas e realização de testes periódicos nos animais).

Considerando que as propriedades dessa mesorregião são pequenas e médias, medidas que envolvam maior custo, como seleção de animais negativos e realização de exames, inicialmente poderiam representar uma dificuldade ao controle da paratuberculose. Além disso, a realização de exames pode ser limitada pela baixa disponibilidade de laboratórios no país que realizem esse tipo de diagnóstico. Entretanto, modificações simples no manejo dos animais podem ser recomendadas e facilmente realizadas pelos

produtores, pois não envolvem custos significativos e auxiliam no efetivo controle dessa doença.

A ocorrência da doença resulta em perdas econômicas mais significativas e elevados custos para controle. Por essas razões, a prevenção deve ser incentivada em locais onde a doença ainda não está estabelecida (Kennedy & Benedictus, 2001).

6. Conclusões

De 41 propriedades de caprinos leiteiros da mesorregião da Zona da Mata de Minas Gerais, dez propriedades foram objetos desse estudo. Todas as propriedades foram caracterizadas através da aplicação de um questionário, onde foram obtidos dados quanto a características do entrevistado e da propriedade, sendo possível a realização de análise das respostas dadas, a fim de elucidar as características produtivas e econômicas da atividade nessa mesorregião.

Através de técnicas microbiológicas e moleculares, foi possível concluir que Map está presente nas propriedades estudadas, apresentando prevalência de 2,36% (11/467). Todos os isolados de Map foram caracterizados como sendo do tipo C (*cattle*). Novos estudos podem ser conduzidos no que se refere à biologia molecular, com a padronização e a realização de outros testes de caracterização dessas cepas.

7. Anexos

Anexo 1: Comitê de Ética

Viçosa, 23 de maio de 2013

Ilma. Sra
Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
Coordenadora do Projeto
DVT/UFV

Sra. Coordenadora,

Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa intitulado “*Paratuberculose e Artrite-encefalite caprina em propriedades leiteiras do Estado de Minas Gerais: identificação, determinação dos fatores de risco e ações interventivas/participativas*”, aqui nomeado Processo 12/2013, a CEUA/UFV emite parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, baseado nas Normas para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT/UFV, no Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, nas Normas da SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) e a legislação vigente.

Acresce a esse Parecer a exigência de Relatório Final de Atividades conforme itens a seguir:

RESUMO DOS RESULTADOS FINAIS OBTIDOS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO
UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NO PROJETO DE PESQUISA

1. Número do protocolo de submissão do projeto de pesquisa à CEUA/UFV:
2. Metodologia completa obrigatoriamente com:
 - Local (is) Geral e específico oficial (is) onde ocorreram a experimentação;
 - O nome científico do animal em questão;
 - Número Total de Animais Utilizados na Pesquisa.
3. Resultados:
4. Nome do Coordenador do Projeto:
Assinatura:
5. Nome do Responsável Técnico:
Assinatura:
Inscrição em CRMV:



Prof. Cláudio César Fonseca
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV
Coordenador

Anexo 2: Reagentes necessários para o preparo de um litro de meio HEYM.

Reagente	Quantidade
Peptona	9,0 g
Cloreto de sódio	4,5 g
Extrato de carne	2,7 g
Glicerol	27 mL
Piruvato de sódio	4,1 g
Ágar bacteriológico	15,3 g
Água destilada	870 mL
Micobactina <i>J</i>	2 mL
Etanol P.A.	4 mL
Gema de ovos	120 mL
Verde malaquita	5,1 mL
Vancomicina	20 mg
Anfotericina B	150 mg
Ácido nalidíxico	20 mg

Anexo 3: Questionário e termo de consentimento

QUESTIONÁRIO – PROPRIEDADES DE CAPRINOS LEITEIROS

Nome: _____

Propriedade: _____ Município: _____

Data: ___ / ___ / ___ Contato: _____ Idade: _____

I – Características do entrevistado

1- O entrevistado é:

proprietário arrendatário funcionário

2- Há quanto tempo o entrevistado trabalha com caprinos? _____

3- A caprinocultura é sua atividade principal? Sim Não

4- Está associado a alguma cooperativa? Sim Não

5- Qual o grau de escolaridade do entrevistado?

Ensino fundamental incompleto

Ensino fundamental completo

Ensino médio incompleto

Ensino médio completo

Ensino superior incompleto

Ensino superior completo

II – Características da propriedade

6- Qual a área da propriedade? < 100ha 100-500ha > 500ha

7- Qual a área utilizada com caprinos? _____

8- Tem energia elétrica? Sim Não

9- Há outras espécies animais na propriedade? Sim Não

Bovinos _____

Ovinos _____

Equinos _____

Cães _____

Gatos _____

10- Há quanto tempo cria caprinos? _____

11- Tipo de exploração: Carne Leite Mista

12- Qual o regime de criação? Confinamento Extensivo

13- Qual o número total de animais? _____

Fêmeas adultas _____

Machos adultos _____

Cabritas _____

Cabritos _____

III – Aspectos econômicos

- 14- A caprinocultura é rentável economicamente? Sim Não
15- Há empregados na propriedade? Sim Não _____
16- O leite é vendido para consumo? Sim Não
17- Por quanto o litro do leite é vendido? _____
18- Qual o lucro por litro de leite? _____

IV – Aspectos produtivos

- 19- Há identificação dos animais? Sim Não Qual? _____
20- Qual a raça explorada? _____
21- Qual o tipo de instalação? Piso suspenso ripado Chão batido Uso de cama
22- Qual o material da cama? _____
23- Qual a origem da cama? _____
24- No período de um ano:
a) Quantos animais nascem? _____
b) Quantos animais morrem? _____
25- Tem tanque de resfriamento? Sim Não
26- Qual o número total de animais em lactação? _____ %: _____
27- Qual o período médio de lactação dos animais? _____
28- Qual a produção total de leite por dia? _____ Animal/dia: _____
29- Quantas ordenhas são realizadas por dia?
 Uma (1) Duas (2) Uma ou duas, dependendo da estação do ano

V – O leite

- 30- O leite é consumido em casa? Sim Não
31- Faz algum tratamento antes do consumo? Sim Não
Qual? _____

VI – Aspectos sanitários

- 32- Tem sala de ordenha? Sim Não
33- A ordenha é: mecânica manual
34- Realiza a higiene na ordenha? Sim Não

35- A água utilizada para o consumo dos animais é de qual origem?

36- Realiza a limpeza dos bebedouros? Sim Não Frequência: _____
37- Tem assistência veterinária? Sim Não Já teve
38- Com que frequência? _____
39- Realiza vacinação? Sim Não _____
40- Para aplicação de medicamentos, realiza a troca de agulhas? Sim Não

- 41- Realiza vermifugação? Sim Não Via: _____ Freqüência: _____
- 42- Quais são os principais problemas sanitários encontrados?
- Anemia
 - Edema de barbeta
 - Diarreia
 - Aborto
 - Mastite
 - Carço (Linfadenite Caseosa)
 - Outros: _____
- 43- Tem área de isolamento para animais doentes? Sim Não
- 44- Realiza a cura do umbigo ao nascimento? Sim Não Como? _____
- 45- Realiza a limpeza e desinfecção das instalações? Sim Não Freqüência: _____
Como? _____
- 46- Qual o destino dos estercos? _____
- 47- Realiza o descarte de animais? Sim Não
- 48- Qual o manejo com animais mortos? _____
- 49- Realiza a secagem dos animais? Sim Não
Como? _____

VII – Aspectos nutricionais

- 50- Produz ou compra alimentos para os animais? Produz Compra
- 51- O que é fornecido para aleitamento? _____ Por quanto tempo?

- 52- O aleitamento é: natural artificial
- 53- O colostro é tratado? Sim Não _____
- 54- Qual o tipo de instalação de comedouro? Para fora da instalação Para dentro da instalação

VIII – Aspectos reprodutivos

- 55- Qual a idade ao primeiro parto? _____
- 56- Qual o tempo de intervalo entre partos? < 12 meses 12 meses > 12 meses
- 57- Qual o sistema de reprodução? Monta controlada Inseminação artificial
- 58- Qual a origem do reprodutor? Compra Da propriedade
- 59- Há separação dos animais perto do parto? Sim Não

Projeto: Paratuberculose e Artrite-Encefalite Caprina em propriedades leiteiras do Estado de Minas Gerais: identificação, determinação dos fatores de risco e ações interventivas/participativas

Professores responsáveis:

Maria Aparecida Scatamburlo Moreira – Telefone: (31) 3899-1470

Abelardo Silva Júnior – Telefone: (31) 3899-1471

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Em _____ de _____ de 20__, eu, _____, carteira de RG _____, fui procurado(a) por _____ RG _____, participante do presente estudo, no endereço _____.

Na ocasião fui solicitado(a) a colaborar para com o projeto acima referido, permitindo a realização de entrevista para preenchimento de questionário sobre temas relacionados à produção de caprinos leiteiros em minha propriedade e a coleta de material fecal, leite e sangue de meus animais, com o objetivo de identificar possíveis agentes causadores de doenças. A partir dessas informações será verificada a existência de associação entre os fatores da propriedade e a infecção por microrganismos eventualmente identificados.

Conforme esclarecimento dos pesquisadores, os resultados dos exames serão informados única e exclusivamente aos envolvidos. No caso de ocorrerem resultados positivos, em qualquer coleta, serei orientado(a) a procurar o serviço veterinário para orientação sobre o tratamento ou manejo do(s) animal(is) afetado(s).

A participação no estudo é voluntária, portanto não existe remuneração ou vínculo empregatício, e poderei me recusar a participar ou me retirar do estudo a qualquer momento, sem prejuízo ou justificativa. Qualquer enfermidade ocorrida durante a pesquisa não é de responsabilidade da equipe, uma vez que os procedimentos adotados não estão associados a qualquer dano à saúde. Assim, a equipe de trabalho fica isenta da obrigação de tratamento de enfermidade durante o estudo.

Terminado o trabalho de coleta dos dados, e tendo garantido o material necessário ao desenvolvimento do projeto, foi-me garantido que toda e qualquer referência que permita a identificação da propriedade será destruída, garantindo assim sigilo absoluto das informações. Os resultados da pesquisa serão analisados e foi-me assegurada total privacidade. Em contrapartida, cedo aos pesquisadores o direito de utilizar as informações prestadas e os resultados para a realização e publicação do trabalho, direito limitado única e exclusivamente para este fim, sem qualquer tipo de identificação, não sendo permitido qualquer outro tipo de uso das mesmas.

_____, _____ de _____ de _____.

Assinatura do(a) entrevistado(a)

Responsável pela aplicação do questionário

8. Referências Bibliográficas

ALVES, F. S. F. & OLANDER, H. Uso de vacina toxoide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Veterinária Notícias**, n. 5, p. 69-75, 1999.

ASSIS, A. P. M. V. & GOUVEIA, A. M. G. Evidências sorológicas de lentivírus (MaediVisna/Artrite Encefalite Caprina) em rebanhos nos estados de MG., RJ., BA., CE. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 23, 1994, Recife. *Anais...* Recife: 1994, p. 104.

AYELE, W. Y., SVASTOVA, P., ROUBAL, P., BARTOS, M., PAVLIK, I. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1210-1214, 2005.

BANG, O. Avian tuberculin as a diagnostic agent in chronic infection enteritis of cattle. **Manedsskrift for Dyrlaeger**, v. 21, p. 561-570, 1910.

BARAD, D. B., CHANDEL, B.S., DADAWALA, A. I., CHAUHAN, H. C., KHER, H. S., SHROFF, S. Incidence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Mehsani and Surti Goats of Indian Origin using Multiple Diagnostic Tests. **Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 02, p. 124-133, 2014.

BARCLAY, R. & RATLEDGE, C. Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. **Journal of Bacteriology**, v. 153, n. 03, p. 1138-1146, 1983.

BARCLAY, R., EWING, D. F., RATLEDGE, C. Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium paratuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 164, n. 02, p. 896-903, 1985.

BIET, F., SEVILLA, I. A., COCHARD, T., LEFRANÇOIS, L. H., GARRIDO, J. M., HERON, I., JUSTE, R. A., MCLUCKIE, J., THIBAUT, V. C., SUPPLY, P., COLLINS, D. M., BEHR, M.A., STEVENSON, K. Inter- and Intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 264. 2012.

BORGES, C. H. P. & BRESSLAU, S. Produção de leite de cabra em confinamento. In: **VI Simpósio de Pecuária do Nordeste – PECNORDESTE. III Semana da Caprinovinocultura Brasileira**. Fortaleza-CE, 04/07 a 07/06/2002. 2002.

BORGES, C. H. P. Custos de produção de leite de cabra na região Sudeste do Brasil. In: **II Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte e I**

Simpósio Internacional sobre o Agronegócio da Caprinocultura Leiteira.

João Pessoa-PB, 29/09 a 03/10/2003. 2003.

BORGES, I. & GONÇALVES, L. C. Manual prático de caprino e ovinocultura.

Universidade Federal de Minas Gerais, 111p, 2002. Disponível em: <

<http://wp.ufpel.edu.br/uniovinos/files/2014/06/apostilacapriov.pdf> >. Acesso em

15/05/2015, às 06h13min.

BUSH, R. R., WINDSOR, P. A., TORIBIO, J. A. Losses of adult sheep due to

ovine Johne's disease in 12 infected flocks over a 3-year period. **Australian**

Veterinary Journal, v. 84, n. 7, p. 246-253, 2006.

CABRITA, A. M. F. L. Curvas de lactação em cabras Saanen, Alpinas e

cruzadas. **Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de**

Lisboa (Dissertação de Mestrado), 83p., 2013.

CARMINATI, R., BAHIA, R., COSTA, L. F. M., PAULE, B. J. A., VALE, V. L.,

REGIS, L., FREIRE, S. M., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., MEYER, R.

Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA

indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de**

Ciências Médicas e Biológicas, v. 2, n. 1, p. 88-93, 2003.

CARVALHO, I. A. Isolamento e detecção molecular de *Mycobacterium avium*

subespécie *paratuberculosis* (Map) em rebanhos bovinos leiteiros na região de

Viçosa-MG. **Universidade Federal de Viçosa** (Dissertação de Mestrado), 72p.,

2008.

CARVALHO, I. A., SILVA, A.J., CAMPOS, V.E., MOREIRA, M. A. S. Short

communication: Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by

polymerase chain reaction in bovine milk in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.

92, p. 5408-5410, 2009.

CARVALHO, I. A., PIETRALONGA, P. A., SCHWARZ, D. G., FARIA, A. C.,

MOREIRA, M. A. S. Recovery of viable *Mycobacterium avium* subspecies

paratuberculosis from retail pasteurized whole milk in Brazil. **Journal of Dairy**

Science, v. 95, n. 12, p. 6946-6948, 2012.

CASTELLANOS, E., DE JUAN, L., DOMÍNGUEZ, L., ARANAZ, A. Progress in

molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

Research in Veterinary Science, v. 92, p. 169-179, 2011.

CASTRO, J. F. M. & SOARES, T. L. Análise das potencialidades

socioeconômicas da Zona da Mata de Minas Gerais (1991-2000): uma

proposta metodológica. **I Encontro de Pesquisadores da História da Zona da Mata Mineira.** Disponível em: <

http://www1.pucminas.br/imagedb/mestrado_doutorado/publicacoes/PUA_ARQ_ARQUI20140508115021.pdf >. Acesso em 25/09/2014, às 20h17min.

CHIODINI, R. J., VAN KRUININGEN, H. J., MERKAL R. S. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. **Cornell Veterinarian**, v. 74, n. 3, p. 218-262, 1984.

CHIODINI, R. J. & HERMON-TAYLOR, J. The thermal resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 4, p. 629-631, 1993.

CLARKE, C.J. Paratuberculosis and molecular biology. **The Veterinary Journal**, v. 153, n. 3, p. 245-247, 1997.

COELHO, A. C., PINTO, M. L., COELHO, A. M., RODRIGUES, J., JUSTE, R. Estimation of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR in sheep blood. **Small Ruminants Research**, v. 76, p. 201-206, 2008.

COLLINS, D. M., STEPHENS, D. M., DE LISLE, G. W. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faeces. **Veterinary Microbiology**, v. 36, p. 289-299, 1993.

COLLINS, D. M. Update on paratuberculosis: 1. Epidemiology of Johne's Disease and the biology *Mycobacterium paratuberculosis*. **Irish Veterinary Journal**, v. 56, n. 11, p. 565-574, 2003.

CORDEIRO, P. R. C., BORGES, C. H. P., BRESSLAU, S. Dados comparativos da contagem de células somáticas do leite de cabra em rebanhos alojados em piso ripado suspenso e piso tipo cama. In: **XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Salvador, 2001.

CORPA, J. M., GARRIDO, J., GARCÍA MARÍN, J. F., PÉREZ, V. Classification of Lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, p. 255-265, 2000.

COSTA, C. A. F. & VIEIRA, L. S. Influência do aprisco de piso ripado suspenso sobre a incidência de nematódeos intestinais em caprinos. **Revista Cabras & Bodes**, v. 03, n. 10, 1987.

CROHN, B. B. et al. Regional ileitis. **Journal of the American Medicinal Association**, v. 99, p. 1232-1239, 1932.

DARCORSO FILHO, P., CAMPOS, I. O. N., FARIA, J. F., LANGENEGGER, J. Doença de Johne (paratuberculose) em bovinos nacionais. **Arquivos do Instituto de Biologia Animal**, v. 3, p. 129-139, 1960.

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

DE JUAN, L., ALVAREZ, J., ARANAZ, A., RODRÍGUEZ, A., ROMERO, B., BEZOS, J., MATEOS, A., DOMÍNGUEZ, L. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 115, p. 102-110, 2006b.

DIMARELI-MALLI, Z., STEVENSON, K., SARRIS, K., SOSSIDOU, K. Study of Microbiological and Molecular Typing Aspects of Paratuberculosis in Sheep and Goats in Northern Greece. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 56, p. 285-290, 2009.

DIMARELI-MALLI, Z. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected sheep and goats. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 8, n. 1, p. 44-50, 2010.

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

DUBEUF, J. P., MORAND-FEHR, P., RUBINO, R. Situation, changes and future of goat industry around the world. **Small Ruminants Research**, v. 51, n. 2, p. 165-173, 2004.

DUBEUF, J. P. Characteristics and diversity of the dairy goat production systems and industry around the world. Structural, market and organizational conditions for their development. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 4, n. 4, p. 25-31, 2010.

DUPONT, O. **Jornal do Commercio**, v. 5/11, p. 8, 1915.

ELLINGSON, J. L. E., CHEVILLE, J. C., BREES, D. MILLER, J. M., CHEVILLE, N. F. Absence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* components from Crohn's disease intestinal biopsy tissues. **Clinical Medicine & Research**, v. 1, n. 3, p. 217-226, 2003.

EMBRAPA. Compostagem: destino correto para animais mortos e restos de parição. **Embrapa Aves e Suínos/SC**, p. 28-38. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/compostagem_destino_correto_para_animais_mortos_e_restos_de_paricao_000fyr7aw9502wx5ok0pvo4k37obz7nl.pdf >. Acesso em 04/05/2015, às 16h50min.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: < <http://www.fao.org.br> >.

FIORENTINO, M. A., GIOFFRÉ, A., CIRONE, K., MORSELLA, C., ALONSO, B., DELGADO, F., PAOLICCHI, F. First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a dairy goat in Argentina: Pathology and molecular characterization. **Small Ruminants Research**, v. 108, p. 133-136. 2012.

FREITAS, T.D. et al. Epidemiological characterization and risk factors associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy goats in the Brazilian semiarid region. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 267-276, 2015.

GIESE, S. B. & AHRENS, P. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. **Veterinary Microbiology**, v. 77, n. 3-4, p. 291-297, 2000.

GONÇALVES, H. C., SILVA, M. A., RAMOS, A. A., ESPESCHIT, C. J. B., WECHSLER, F. S. Fatores genéticos e de meio no intervalo de partos de caprinos leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 05, p. 905-913, 1997.

GONÇALVES, H. C., SILVA, M. A., WECHSLER, F. S., RAMOS, A. A. Fatores genéticos e de meio na produção de leite de caprinos leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 03, p. 719-729, 2001.

GONÇALVES, H. C., WECHSLER, F. S., RAMOS, A. A. Fatores genéticos e ambientais na duração da lactação de caprinos leiteiros. **Boletim de Indústria Animal**, v. 59, n. 3, p. 17-29, 2002.

GOUVEIA, A. M. G., GUIMARÃES, A. S., HADDAD, J. P. A, ABREU, C. P., LEITE, R. C., HEINEMANN, B. C., LAGE, A. P., CRUZ, J. C. M., CARMO, F. P. Características zoonóticas da caprinocultura leiteira em Minas Gerais, Brasil.

Disponível em: <
http://www.caprileite.com.br/arquivos/CaracteristicaszoonoticasdaCaprinoculturaLeiteiradeMG_ok_07032013_103522.pdf > Acesso em 11/05/2015, às 11h04min.

GRANT, I. R., BALL, H. J., ROWE, M. T. Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 461-465, 1999.

GRANT, I. R., O'RIORDAN, L. M., BALL, H. J., ROWE, M. T. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw sheep and goats' milk in England, Wales and Northern Ireland. **Veterinary Microbiology**, v. 79, p. 123-131, 2001.

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

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

GUIMARÃES, A. S. Caracterização da caprinovinocultura em Minas Gerais. Belo Horizonte: **Universidade Federal de Minas Gerais** (Dissertação de Mestrado), 87p. 2006.

HAWKEY, P. M. The role of polymerase chain reactions in the diagnosis of mycobacterial infections. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 5, p. 21-32, 1994.

IBGE, 1996. Censo Agropecuário de 1996. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/1995_1996/default.shtm >. Acesso em 19/09/2014, às 15h48min.

IBGE, 2002. Atlas Geográfico Escolar. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: < <http://www.atlasescolar.ibge.gov.br> >. Acesso em 16/05/2014, às 09h12min.

IBGE, 2006. Censo Agropecuário de 2006. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.shtm> >. Acesso em 19/09/2014, às 13h23min.

JANAGAMA, H.K., SENTHIKUMAR, , BANNATINE, J. P., KUGADAS, A., JAGTAP, P., HIGGINS, L., WITTHUHN, B., SREEVATSAN, S. Iron-sparing response of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 268, 2010.

JOHNE, H. A. & FROTHINGHAM, L. Ein eigenthümlicher fall von tuberkulose beim rinde, [A peculiar case of tuberculosis in a cow]. **Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und Vergleichende Pathologie**, v. 21, p. 438-454, 1895.

Johne's Disease – Questions and Answers for Goat Owners – Disponível em: <<http://johnes.org>>. Acesso em 18/08/2014, às 09h26min.

KENNEDY, D.J. & BENEDICTUS, G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v.20, n. 1, p. 151-179, 2001.

KHARE, S., FITCH, T. A., SANTOS, R. L., ROMANO, J. FICHT, A. R., ZHANG, S., GRANT, I. R., LIBAL, M., HUNTER, D., ADAMS, L. G. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 03, p. 1075-1081, 2004.

KHODAKARAM TAFTI, A. & RASHIDI, K. The Patology of Goat Paratuberculosis: Gross and Histopathological Lesions in the Intestines and Mesenteric Lymph Nodes. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 47, p. 487-495, 2000.

KRUZE, J., SALGADO, M., PAREDES, E., MELLA, A., COLLINS, M. T. Goat paratuberculosis in Chile: first isolation and confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a dairy goat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 476-479. 2006.

LAMBETH, C., REDDACLIFF, L. A., WINDSOR, P., ABBOTT, K. A., MCGREGOR, H., WHITTINGTON, R. J. Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 8, p. 504-508, 2004.

LARSEN, A. B., MERKAL, R. S., CUTLIP, R. C. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 3, n. 03, p. 255-257, 1975.

LI, L., BANNANTINE, J. P., ZHANG, Q., AMONSIN, A., MAY, B. J., ALT, D., BANERJI, N., KANJILAL, S., KAPUR, V. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 35, p. 12344-12349, 2005.

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

MAGALHÃES, H. H. Diagnóstico da situação da caprinocultura em algumas microrregiões dos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. **Revista Cabras & Bodes**, v. 1, n. 0, p. 5-7. 1985.

MARSH, I., WHITTINGTON, R., COUSINS, D. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. **Molecular and Cellular Probes**, v.13, p. 115-126. 1999.

MCFADYEAN, J. Annual report for 1906 of the principal of the Royal Veterinary College. **Journal of the Royal Agr. Society of England**, v. 67, p. 230-241, 1906.

MEDEIROS, J. M. A., JUNIOR, F. G., ALMEIDA, A. P., LUCENA, E. A., RIET-CORREA, F. Paratuberculose em caprinos e ovinos no estado da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.2, p. 111-115, 2012.

MIGUEL, P. R. R. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 403-416, 2012.

MOTA, R. A., PEIXOTO, P. V., YAMASAKI, E. M., MEDEIROS, E. S., COSTA, M. M., PEIXOTO, R. M., BRITO, M. F. Ocorrência de paratuberculose em

búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 03, p. 237-242, 2010.

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

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

NEBBIA, P., ROBINO, P., ZOPPI, S., MENEGHI, D. Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. **Small Ruminants Research**, v. 66, p. 116-120, 2006.

OIE, 2006. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. **Organização Mundial de Saúde Animal**. Disponível em: < http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00045.htm >. Acesso em 12/04/2013, às 18h47min.

OIE, 2014. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. **Organização Mundial de Saúde Animal**. Disponível em: < http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARAT_B.pdf >. Acesso em 11/05/2015, às 08h17min.

OLIVEIRA, D. M., RIET-CORREA, F., GALIZA, G. J. N., ASSIS, A. C. O., DANTAS, A. F. M., BANDARRA, P. M., JUNIOR, F. G. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 01, p. 67-72, 2010.

PAYEUR, J.B. Current culture methods for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **Proceedings of 8ICP**, p. 352-357, 2005.

PILLAI, S.R. & JAYARAO, B.M. Application of IS900 PCR for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Directly from Raw Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 5, p. 1052-1057, 2002.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 512 p., 2005.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária**: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1737p., 2002.

ROCCA, S., CUBEDDU, T., NIEDDU, A. M. S., PIRINO, S., APPINO, S., ANTUOFERMO, A. Detection of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (Map) in samples of sheep paratuberculosis (Johne's Disease or JD) and human Crohn's disease (CD) using liquid phase RT-PCR, in situ RT-PCR and immunohistochemistry. **Small Ruminant Research**, v. 88, p. 126-134, 2010.

SCHWARZ, D. G. G., CARVALHO, I. A., PIETRALONGA, P. A. G., FARIA, A. C. S., MOREIRA, M. A. S. Paratuberculose em pequenos ruminantes domésticos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 3, p. 443-452, 2012.

SEVILLA, I., SINGH, S. V., GARRIDO, J. M., ADURIZ, G., RODRIGUEZ, S., GEIJO, M. V., WHITTINGTON, R. J., SAUNDERS, V., WHITLOCK, R. H., JUSTE, R. A. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 24, n. 3, p. 1061-1066. 2005.

SHANKAR, H., SINGH, S. V., SINGH, P. K., SINGH, A. V., SOHAL, J. S., GREENSTEIN, R. J. Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk, and milk products in India by culture, PCR, and REA-PCR methods. **International Society for Infectious Diseases**, v. 14, p. 121-126. 2010.

SHIN, S. J., CHANG, Y. F., HUANG, C., ZHU, J., HUANG, L., YOO, H. S., SHIN, K. S., STEHMAN, S., SHIN S. J., TORRES, A. Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in culture. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 02, p. 116-120. 2004.

SIBLEY, J. A. Molecular tools for the characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **University of Saskatchewan**, 96 p. 2005.

SIGUROARDÓTTIR, O.G., VALHEIM, M., PRESS, C. M. Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 819-834, 2004.

SILVA, H. W., GUIMARÃES, C. R. B., OLIVEIRA, T. S. Aspectos da exploração da caprinocultura leiteira no Brasil. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 2, n. 2, p. 121-125, 2012.

- SINGH, S. V. & VIHAN, V. S. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 54, p. 231-235, 2004.
- SINGH, S. V., SINGH, A. V., KUMAR, A., SINGH, P. V., DEB, R., VERMA, A. K., KUMAR, A., TIWARI, R., CHAKRABORTY, S., DHAMA, K. Survival mechanisms of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within host species and in the environment – A review. **Natural Science**, v. 5, n. 6, p. 710-723, 2013.
- SINGH, A. V., CHAUHAN, D. S., SINGH, A., SINGH, P. K., SOHAL, J. S., SINGH, S. V. Application of IS1311 locus 2 PCR-REA assay for the specific detection of 'Bison type' *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates of India origin. **Indian Journal of Medicine Residence**, v. 141, p. 55-61. 2015.
- SIVAKUMAR, P., TRIBATHI, B. N., SINGH, N. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 263-270, 2005.
- SOUZA, V., BENEVIDES, S. D., OLIVEIRA, L. S., SANTOS, V. O. Aspectos importantes para obtenção de Leite de Cabra com Qualidade. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 111, 53p., 2014. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107255/1/DOC-111.pdf> >. Acesso em 15/05/2015, às 06h45min.
- STABEL, J. R. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 375-380, 1997.
- STEHMAN, S. M. & SHULAW, W. P. **Paratuberculosis (Johne's disease) in sheep and goats**: recommendations for diagnosis and control. Saint Joseph, MO: United States Animal Health Association, Committee on Sheep and Goats, 1996.
- STEHMAN, S. M. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 12, n. 2, p. 441-445, 1996.

STEVENSON, K. & SHARP, J. M. The contribution of molecular biology to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* research. **The Veterinary Journal**, v. 153, n. 03, p. 269-286, 1997.

STEVENSON, K., HUGHES, V. M., DE JUAN, L., INGLIS, N. F., WRIGHT, F., SHARP, J. M. Molecular Characterization of Pigmented and Nonpigmented Isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 05, p. 1798-1804, 2002.

TERRIL, C. E. & FOOTE, W. C. Estimating reproductive performance in goat. In: **International Conference on Goat**, Brasília, v.1, p.577-583, 1987.

THOREL, M. F., KRICHEVSKY, M., LÉVY-FRÉBAULT, V. V. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. *nov.*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. *nov.*, and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. *nov.* **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, p. 254-260, 1990.

TIMMS, V. J., GEHRINGER, M. M., MITCHELL, H. M., DASKALOPOULOS, G., NEILAN, B. A. How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p. 1-8, 2011.

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

VALENTIN-WEIGAND, P. & GOETHE, R. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 1121-1127, 1999.

VESCHI, J. L. A. et al. Principais clostridioses dos ovinos e caprinos: sinais clínicos e medidas preventivas. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 144, 6p., 2010. Disponível em: <

http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/public_eletronica/downloads/COT144.pdf

>. Acesso em 15/05/2015, às 06h35min.

WHIPPLE, D.L. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standard procedure. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 368-373, 1991.

WHITTINGTON, R.J., MARSH, I., CHOY, E., COUSINS, D. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* e *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, p. 349-358. 1998.

WHITTINGTON, R.J., MARSH, I. B., WHITLOCK, R. H. Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, p. 139-145, 2001.

ZAMBOM, M. A., ALCALDE, C. R., MARTINS, E. N., SANTOS, G. T., MACEDO, F. A. F., HORTS, J. A., VEIGA, D. R. Curva de lactação e qualidade do leite de cabras Saanen recebendo rações com diferentes relações volumoso:concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 06, p. 2515-2521, 2005.