

ISIS DE FREITAS ESPESCHIT BRAGA

***Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP):
IDENTIFICAÇÃO ÁGUA E FATORES DE RISCO PARA A
PRESENÇA EM AMOSTRAS DE BIÓPSIAS INTESTINAIS**

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

B813m
2015
Braga, Isis de Freitas Espescht, 1990-
Mycobacterium avium ssp. *Paratuberculosis* (MAP) :
identificação em água e fatores de risco relacionados à
presença em biópsias intestinais / Isis de Freitas Espescht
Braga. - Viçosa, MG, 2015.
xii, 123f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

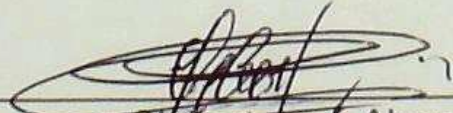
1. Ruminantes - Doenças. 2. Paratuberculose.
3. *Mycobacterium avium*. 4. *Paratuberculosis*. 5. Crohn,
Doença de. 6. Água - Contaminação. 7. Intestino - Doenças.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.20896

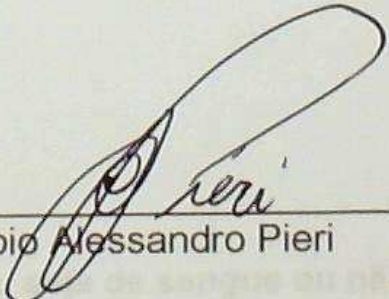
***Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: IDENTIFICAÇÃO EM ÁGUA
E FATORES DE RISCO RELACIONADOS À PRESENÇA EM BIÓPSIAS
INTESTINAIS**

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: 20 de fevereiro de 2015.



Clebert José Alves



Fábio Alessandro Pieri



Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Orientadora)

À minha família, seja de sangue ou não.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha família por todo o apoio, de todas as formas possíveis, permitindo que mais essa vitória fosse possível.

À minha orientadora, professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, que me guiou por anos à fio e moldou a profissional que sou hoje.

Ao Joao Carlos, Fábio e Isabel, amigos e colegas de LDBAC, pelo companheirismo amizade pelos preciosos ensinamentos.

Aos colegas de trabalho, do LDBAC, pelas risadas, tubos lavados, e amizade.

Aos funcionários do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da UFV, da Divisão de Água e Esgoto e do Ambulatório de intestino do Hospital das Clínicas da UFMG, em especial à Adriana, à Carolina e o Janderson por todo apoio e ajuda.

Aos amigos Juliana, Marina e Arrigo que deixaram de lado seus compromissos para me ajudar, até mesmo em fins de semana e madrugadas.

À República As Descontroladas, por ter me recebido e acolhido por sete anos, e pelas amizades ali construídas. À Rosi, pelo apoio burocrático e pela prontidão e pelo sorriso em qualquer situação.

Àos pacientes do Ambulatório de Intestino e aos proprietários das fazendas de caprinocultura, pela hospitalidade e simpatia. À Universidade Federal de Viçosa, pela minha formação profissional e ética. À querida Viçosa, por ter sido meu lar durante 7 anos. À CAPES pela bolsa de mestrado, que foi fundamental para o meu sustento e permanência em Viçosa.

Às professoras Maria de Lourdes Abreu Ferrari e Paula Dias Bevilacqua pela coorientação. Ao professor Rafael Bastos por me acolher em seu laboratório permitindo a realização dos experimentos relacionados à água.

Aos amigos que sempre acreditaram em mim e fizeram o possível para que tudo desse certo. À todos os que contribuíram com seus conhecimentos e experiências para esta conquista.

Muito

Obrigado

BIOGRAFIA

Isis de Freitas Espeschit Braga, filha de Maria de Lourdes Rosa de Freitas e Eduardo Espeschit Braga nasceu no dia 23 de dezembro de 1990.

Em março de 2008, iniciou seus estudos acadêmicos na Universidade Federal de Viçosa, MG, no curso de Medicina Veterinária. Em maio de 2013, pela mesma instituição, graduou-se Médica Veterinária.

Em Abril de 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, sob orientação da Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

Recentemente foi aprovada na seleção do mesmo programa, à nível de doutorado, previsto para iniciar em Março de 2015.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	7.
CAPÍTULO 1- Paratuberculose na América latina: uma revisão sistemática.....	8
CAPÍTULO 2- <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> em água para consumo humano e animal da Zona da Mata mineira e caracterização das propriedades.....	49
CAPÍTULO 3- Fatores de risco para a presença de <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> em amostras de biópsias intestinais humanas.....	90
CONCLUSÕES GERAIS.....	123

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1- PARATUBERCULOSE NA AMÉRICA LATINA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Figura 1- Mapa representando os países latino-americanos.....22

CAPÍTULO 2- MYCOBACTERIUM AVIUM SSP. PARATUBERCULOSIS EM ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO E ANIMAL DA ZONA DA MATA MINEIRA E CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES

Figura 1-Mapa da macrorregião da Zona da Mata mineira, os pontos representam as propriedades.....55

Figura 2- Amostras de água para consumo animal inoculadas em meio Herold com gema de ovo Inoculadas com amstras de água para consumo animal. A.; tubo sem micobactina J. B e C tubos com micobactina J demonstrando crescimento típico de MAP:60

Figura 3- Esfregaço de colônias crescidas em meio Herold com gema de ovo, com micobactina J, a partir de amostras de água para consumo animal, corado com Ziehl Neelsen, seta demonstrando clumpins de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Aumento:1000x.....60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1- Paratuberculose na América latina: uma revisão sistemática

Tabela 1- Sumarização dos trabalhos incluídos na revisão, organizados por país.....	16
---	----

CAPÍTULO 2- Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis em água para consumo humano e animal da Zona da Mata mineira e caracterização das propriedades

Tabela 1-Distribuição das propriedades produtoras de leite de cabra nas microrregiões da Zona da Mata Mineira	55
---	----

Tabela 2-Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na detecção pela técnica de PCR.....	58
---	----

Tabela 3- Programa de PCR utilizado na detecção de DNA de MAP das amostras de água.....	58
---	----

Tabela 4- Variáveis relacionadas à propriedade e entrevistado segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo animal.....	63
--	----

Tabela 5- Variáveis econômicas e produtivas segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo animal.....	64
--	----

Tabela 6- Variáveis sanitárias segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo animal.....	67
---	----

Tabela 7- variáveis nutricionais segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo animal.....	69
---	----

Tabela 8- Variáveis reprodutivas segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo animal.....	70
---	----

Tabela 9- Variáveis relacionadas a propriedade e ao entrevistado segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo humano.....	71
---	----

Tabela 10- Variáveis econômicas e produtivas segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo humano.....	72
---	----

Tabela 11- Variáveis sanitárias segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo humano.....	74
--	----

Tabela 12 Variáveis nutricionais segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo humano.....75

Tabela 13 Variáveis reprodutivas segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo humano.....76

CAPÍTULO 3- Fatores de risco para a presença de *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* em amostras de biópsias intestinais humanas

Tabela 1- Categorias atribuídas às variáveis pesquisadas para a análise bivariada.....97

Tabela 2- Distribuição de dados do indivíduo e socioeconômicos segundo a detecção de MAP em biópsias intestinais através da técnica de PCR.....99

Tabela 3-Distribuição das variáveis relacionadas a saneamento, segundo a detecção de MAP em biópsias intestinais através da técnica de PCR.....102

Tabela 4- Distribuição de variáveis relacionadas à saúde e agravos intestinais segundo a detecção de MAP em biópsias intestinais através da técnica de PCR..... 103

Tabela 5- Distribuição das variáveis relacionadas ao consumo de produtos lácteos segundo a detecção de MAP em biópsias intestinais através da técnica de PCR..... 107

Tabela 6-Distribuição de variáveis relacionadas a histórico familiar de agravos intestinais segundo a detecção de MAP em biópsias intestinais através da técnica de PCR..... 109

Tabela 7-Distribuição de variáveis categorizadas em exposto e não exposto entre casos e controles e seus resultados a análise bivariada.....111

RESUMO

ESPESCHIT, Isis de Freitas; M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. ***Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP): IDENTIFICAÇÃO ÁGUA E FATORES DE RISCO PARA A PRESENÇA EM AMOSTRAS DE BIÓPSIAS INTESTINAIS.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Paula Dias Bevilacqua e Maria de Lourdes Abreu Ferrari.

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) é o agente etiológico da doença de Johne ou paratuberculose, enterite granulomatosa crônica caracterizada por diarreia persistente e perda de peso progressiva que acomete ruminantes. Pode também ser isolado a partir de amostras intestinais de pacientes humanos, com doenças intestinais, principalmente portadores da doença de Crohn. Essa é uma doença de etiologia desconhecida, que se caracteriza por inflamação crônica, focal, assimétrica transmural e ocasionalmente granulomatosa, que pode acometer qualquer segmento do tubo digestivo. O isolamento de MAP e as semelhanças entre os processos clínicos e histopatológicos da paratuberculose e da doença de Crohn são algumas das razões pelas quais se investiga o potencial zoonótico da bactéria. As principais vias de eliminação do agente são através do leite e das fezes que contaminam os pastos e, direta ou indiretamente os cursos d'água podendo dessa forma infectar humanos pela ingestão de água contendo o micro-organismo viável. MAP é uma bactéria resistente e responsável por grandes prejuízos econômicos e produtivos, sendo demonstrada sua sobrevivência no ambiente por longos períodos, além da resistência a pasteurização e à agentes de desinfecção aplicados ao tratamento da água para consumo humano. Diante disso, o estudo teve como objetivos: - identificar fatores de risco envolvidos com a presença de MAP em amostras de intestino humano, através da aplicação de questionário, em conjunto com dados prévios sobre a presença da bactéria em amostras de biópsias intestinais de pacientes portadores de Doença de Crohn, retocolite ulcerativa e portadores de doenças intestinais não inflamatórias, -verificar a presença do agente na água para consumo humano e animal através de PCR convencional e do culti-

vo microbiológico de amostras coletados em 10 propriedades de caprinocultura leiteira da Zona da Mata Mineira e realizar uma revisão bibliográfica dos estudos sobre a paratuberculose na América Latina. Quanto às amostras de água, MAP foi identificado viável em quatro (40%) das amostras de consumo animal, e identificado por PCR em três (30%) das de consumo humano além de uma quinta amostra de consumo animal (10%). Esse resultado demonstra o papel da água como reservatório do agente, mantendo o ciclo de infecção ativo e servindo de amostra confiável para o diagnóstico da presença do agente no rebanho já que, aparentemente não está condicionada a eliminação intermitente, como ocorre com as fezes desses animais. Nesse estudo também puderam ser identificados fatores de risco para a ocorrência do agente na água e em biópsias intestinais humanas, como o consumo de leite e derivados informais, assim como histórico familiar de agravos intestinais. Na América Latina MAP foi pesquisado em 10 países e identificado em nove, infectando, bovinos, caprinos e animais silvestres. Os resultados desse estudo contribuem para a identificação de fatores de risco envolvidos na transmissão de MAP para humanos, permitindo a sugestão de medidas que previnam ou reduzam a exposição ao agente. Esses fatores de risco identificados também demonstram a importância do leite na veiculação do agente por leite e produtos lácteos, com destaque para aqueles que não passaram pela pasteurização. Além disso, os estudos sobre água auxiliaram a elucidação do papel da ingestão da água na transmissão do agente, que não é pesquisado na rotina de tratamento, indicando exposição ao agente para humanos pode ser dar através do consumo de água contaminada por fezes de animais com paratuberculose. Esse estudo foi o primeiro sobre o agente na água no Brasil, e um dos poucos no mundo.

ABSTRACT

ESPESCHIT, Isis de Freitas; M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2015. ***Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP): IDENTIFICATION IN WATER AND RISK FACTORS TO ITS PRESENCE IN BOWEL BIOSPIES..** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coadvisers: Paula Dias Bevilacqua and Maria de Lourdes Abreu Ferrari.

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the etiologic agent of Johne's disease or paratuberculosis, a chronic granulomatous enteritis characterized by persistent diarrhea and progressive weight loss that may affect ruminants. MAP is also isolated from intestinal samples from human patients with intestinal diseases, particularly Crohn's disease patients. This is a disease of unknown etiology that is characterized by chronic inflammation, focal, transmural asymmetric and occasionally granulomatous lesions, which can affect any segment of the digestive tract. The isolation of MAP and the similarities between the clinical and pathologic processes of paratuberculosis and Crohn's disease are some of the reasons for investigating the zoonotic potential of bacteria. The main agent's disposal routes are through feces and milk that contaminate pastures and directly or indirectly the watercourses and can thus infect humans by drinking water containing viable micro-organism. MAP is a resistant bacteria and responsible for significant economic and productive loss, and demonstrated its survival in the environment for long periods, in addition to the resistance to pasteurization and disinfection agents applied to water treatment for human consumption. Thus, the study aimed to: - identify risk factors involved with the presence of MAP in human gut samples, through the questionnaire, together with previous data on the presence of bacteria in samples of intestinal biopsies of patients Crohn's disease, ulcerative colitis and patients with non-inflammatory intestinal diseases, -check the agent's presence in the water for human and animal consumption by conventional PCR and microbiological culture samples collected in 10 properties of dairy goat of the Zona da Mata Mineira and, - conduct a literature review of the studies on paratuberculosis in Latin America. As for the water samples, MAP was identified feasible in four (40%) of

the samples of animal feed, and identified by PCR in three (30%) of human consumption as well as a fifth sample of animal consumption (10%). This result demonstrates the role of water as an agent of the reservoir, keeping the active infection cycle and serving as a reliable sample for the diagnosis of the agent's presence in the herd since apparently is not subject to intermittent shedding, as with the feces of these animals. In this study could also be identified risk factors for the occurrence of the agent in in human intestinal biopsies, as the consumption of unpasteurized milk and informal derivatives as well as family history of bowel diseases. In Latin America MAP was investigated in 10 countries and identified in nine, infecting, cattle, goats and wild animals. The results of this study contribute to the identification of risk factors involved in the MAP transmission to humans, allowing the suggestion of measures to prevent or reduce exposure. These identified risk factors also demonstrate the importance of milk in placement agent for milk and milk products, especially those who have not gone through the pasteurization. Furthermore, studies on water helped to elucidate the role of water ingestion in the transmission of the agent, which is not searched in routine treatment, indicating exposure to the agent for humans can occur through the consumption of water contaminated by faeces of animals carrying paratuberculosis. This study was the first about the agent in water in Brazil, and one of the few in the world.

INTRODUÇÃO GERAL

A paratuberculose ou doença de Johne é uma doença infecciosa crônica, caracterizada por diarreia persistente e perda de peso progressiva, causada por *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* e que acomete principalmente as espécies de ruminantes. O micro-organismo é transmitido pela rota fecal-oral, sendo os animais geralmente infectados no início da vida, ao ingerirem o bacilo (Chiodini et al., 1984; Sweeney, 1996). Outras espécies animais também podem ser infectadas pela bactéria, muitas vezes sem desenvolver a doença. Salgado et al (2011), publicaram a detecção de MAP em lebres selvagens na região sul do Chile, onde os animais habitam próximo a rebanhos bovinos conhecidamente infectados pela bactéria. Os animais da espécie *Lepus europaeus*, tinham seus tecidos com aparência normal, mas, apesar disso, calculou-se uma prevalência de 14,1% do agente. Esses achados indicam que a lebre europeia atua principalmente como um veículo do micro-organismo, sem desenvolver a doença, sugerindo que outros animais além dos ruminantes são importantes no ciclo de infecção e transmissão do agente. (Salgado et al, 2011)

MAP pertence à família Mycobacteriaceae e, em comum com outras micobactérias, sua parede celular é rica em lipídios, característica que lhe confere capacidade de persistir no ambiente e contribui para sua resistência a pHs baixos, altas temperaturas e agentes químicos, além de apresentar a capacidade de formar estruturas “spore like” (Manning, 2001 Lamont et al, 2012). Estas características são essenciais para a epidemiologia da doença. Quando observado ao microscópio, MAP geralmente aparece em aglomerados de centenas de pequenos bacilos, Gram-positivos e Ziehl-Neelsen positivos.

As perdas econômicas devidas à paratuberculose bovina são estimadas em 200 a 250 milhões de dólares por ano, somente nos EUA e se devem à diminuição da produção leiteira, redução nos teores de proteína do leite, descarte prematuro de animais, maior susceptibilidade a outras doenças,

redução na fertilidade e aumento dos custos sanitários (Ott et al., 1999; Hasonova e Pavlik, 2006).

No Brasil, a primeira notificação da doença, se deu em um animal importado, no Rio de Janeiro (Dupont, 1915). Alguns levantamentos relatam a presença de MAP na ordem de 37,9% no estado de São Paulo (Laranja-Da-Fonseca et al., 1999), 18% no estado do Rio de Janeiro (Ferreira et al., 2002), 60,24% em Goiânia (Acypreste et al., 2005) e 45,51% no Mato Grosso do Sul (Gomes et al., 2002). Apesar de nos últimos anos as pesquisas sobre a doença no Brasil terem aumentado, os trabalhos publicados na área ainda são poucos e não representam corretamente a epidemiologia da doença no país. Em 2009, Carvalho et al., utilizando a técnica de PCR detectaram a presença de MAP em 8 (3,6%) amostras de leite das 222 coletadas de rebanhos bovinos leiteiros na região de Viçosa, MG (Carvalho et al., 2009)

Trabalhos publicados indicam que a bactéria pode não ser completamente inativada pela pasteurização do leite a 72°C por 15s (Sung e Collins, 1998; Grant et al., 2002b; Rowe e Grant, 2006; Carvalho et al, 2012). Nos últimos anos, MAP tem causado grande preocupação à indústria mundial de laticínios, devido à questão ainda não resolvida do seu potencial zoonótico, sendo portanto o consumo desses produtos contaminados um risco à saúde pública.(Hermon-Taylor, 2001; Mendoza et al., 2009; Pierce, 2009; Rosenfeld e Bressler, 2010). Os interesses nessa bactéria, com relação à saúde pública, provem do seu frequente isolamento em pacientes com doença de Crohn e outras doenças inflamatórias intestinais e a semelhança entre os processos clínicos e histopatológicos do paciente humano com DC e do animal com Doença de Johnne. Ambas doenças são caracterizadas por inflamação crônica dos intestinos, diarreia e perda de peso. Ambas apresentam períodos de remissão e recidiva, e lesões inflamatórias granulomatosas.

A eliminação de MAP por animais se dá principalmente pelas fezes e pelo leite, podendo ainda ser encontrado viável em produtos lácteos como queijo e em leite pasteurizado. (Carvalho et al, 2012; Faria et al, 2014) Dessa forma o consumo de leite e derivados lácteos pasteurizados, informais ou ainda derivados que não são pasteurizados (queijo canastra e do serro) pode ser

caracterizado como um fator de risco, aumentando as chances de o indivíduo ser contaminado com MAP. Outros fatores como condições desfavoráveis de higiene e saneamento também podem favorecer a exposição ao agente bacteriano, uma vez que sua eliminação é fecal e já foi demonstrada sua capacidade de sobreviver durante longos períodos no ambiente. (Collins, 2003; Lamont et al, 2012).

As fezes dos animais com a Doença de Johne contaminam o local, utensílios, as pastagens e o solo, onde, principalmente durante as chuvas, o agente é drenado, contaminando os cursos d'água. Essa contaminação pode se dar também de forma direta em propriedades onde os animais tem contato direto com rios e riachos, e também em sistemas de criação intensivos, principalmente aqueles sem tratamento dos efluentes. A água contaminada, caso consumida pelas populações, pode ser a fonte de infecção da bactéria para os humanos. Da mesma forma pode a água tratada, transmitir o agente, já que a eliminação pelos processos de tratamento vigentes não está esclarecida e os escassos estudos efetuados indicam a sobrevivência de MAP aos agentes desinfetantes aplicados no tratamento. (Mishina et., al 1996; . Whan et., al 2001. Beumer et., al 2010)

Diante disso, a verificação de fatores de risco para a presença de MAP em intestinos humanos e o levantamento da presença da bactéria em água tratada e de fontes alternativas e de consumo animal, na Zona da Mata mineira estão justificados.

REFERÊNCIAS

Acypreste, C.S.; Juliano, R.S.; Riveira, F.E.B.; Silva, L.A.F.; Fioravanti, M.C.S.; Filho, F.C.D. Uso Da Técnica Do Elisa Indireto Na Detecção De Anticorpos Anti-Mycobacterium *Paratuberculosis* Em Vacas Em Lactação. *Ciência Animal Brasileira*, V.6, P. 41-45, 2005.

Beumer, A; King,D;Donohue,M; Mistry, J; Covert,T E Pfaller, S, *Applied And Environmental Microbiology*, Vol 76 No21,Nov. 2010, P. 7367–7370

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.

Carvalho, I.A.; Silva Jr, A.; Campos, V.E.B.; Moreira, M.A.S. Detection Of *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* By Polymerase Chain Reaction In Bovine Milk In Brazil. Journal Of Dairy Science, V.92, P.5408-5410, 2009.

Carvalho, I.A.; Silva, V.O.; Vidigal, P.M.P.; Silva Junior, A.; Moreira, M.A.S. Genetic Evaluation Of Is900 Partial Sequence Of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Brazilian Isolates From Bovine Milk. Tropical Animal Health And Production, 44 (7), P.1331-1334, 2012.

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.

Dupont, O. **Jornal Do Commercio**, V. 5/11, P. 8, 1915.

Faria, A.C.S., Schwarz, D.G.G., Carvalho, I.A., Rocha, B.B., De Carvalho Castro, K.N., Silva, M.R., Moreira, M.A.S. Short Communication: Viable *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* In Retail Artisanal Coalho Cheese From Northeastern Brazil. 97, 7, P,4111–4114, 2014.

Ferreira, R., L. S. Fonseca, Lilenbaum, W Comparison Between A Commercial And An In-House Elisa For Anti-M. Avium *Paratuberculosis* Antibodies Detection In Dairy Herds In Rio De Janeiro, Brazil. Revista Latinoamericana De Microbiología, V.44, P.129-132. 2002.

Gomes M.J.P., Driemeier D., Ribeiro V.R., Wunder Jr E.A., Asanome W., Lanzon L.F. & Wald V.B. Doença De Johne: Isolamento Do *Mycobacterium Avim* Subsp. *Paratuberculosis* (Map) Em Um Rebanho Leiteiro Infectado Na Região Sul Do Brasil. Acta Scient. Vet. 30(2) P.113-118. 2002.

Grant, I.R; Ball, H.J; Rowe, M.T. Incidence Of *Mycobacterium Paratuberculosis* In Bulk Raw And Commercially Pasteurized Cows' Milk From Approved Dairy Processing Establishments In The United Kingdom. *Applied And Environmental Microbiology*, V.68(5), P.2428-35, 2002

Hasonova, L. E Pavlik, I. Economic Impact Of *Paratuberculosis* In Dairy Cattle Herds: A Review. *Veterinarni Medicina*, V.51, P.193-211. 2006.

Hermon-Taylor, J. Protagonist. *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* Is A Cause Of Crohn's Disease. *Gut*, V.49, N.6, P.755-6. 2001

Lamont, E.A., Bannantine, J.P., Armien, A., Ariyakumar, D.S. And Sreevatsan, S. Identification And Characterization Of A Spore-Like Morphotype In Chronically Starved *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Cultures. *Plos One*, 7 (1):E30648. (2012) Doi: 10.1371/Journal.Pone.0030648

Laranja-Da-Fonseca, L. F., M. V. Santos, Pereira, C. C., Olival, A. A., Hienemenn, M. B., & Richtzenhain, L. J. Identificação da presença de anticorpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 66, 122, 1999

Manning, E. J. *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis*: A Review Of Current Knowledge. *Journal Of Zoo And Wildlife Medicine*, V.32, N.3, P.293-304. 2001.

Mendoza, J. L., Lana, R. E Diaz-Rubio, M. *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* And Its Relationship With Crohn's Disease. *World Journal Of Gastroenterology*, V.15, N.4, P.417-22. 2009.

Mishina D, Katsel P, Brown St, On The Etiology Of Crohn Disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:98 P.16–20.

Ott, S. L., Wells, S. J. E Wagner, B. A. Herd-Level Economic Losses Associated With Johne's Disease On Us Dairy Operations. *Preventive Veterinary Medicine*, V.40, N.3-4, P.179-92. 1999

Pierce, E. S. Where Are All The *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* In Patients With Crohn's Disease? Plos Pathogens, V.5, N.3, P.E1000234. 2009.

Rosenfeld, G. E Bressler, B. *Mycobacterium avium Paratuberculosis* And The Etiology Of Crohn's Disease: A Review Of The Controversy From The Clinician's Perspective. The Canadian Journal Of Gastroenterology, V.24, N.10, P.619-24. 2010.

Rowe, M. T. E Grant, I. R. *Mycobacterium avium Ssp. Paratuberculosis* And Its Potential Survival Tactics. Letters In Applied Microbiology, V.42, N.4, P.305-11. 2006

Salgado Miguel, Elizabeth J. B. Manning, Gustavo Monti, Go" Ran Bo" Lske, Robert Somanuel Ruiz, Enrique Paredes, Sergio Leiva, Herbert Van Kruningen, And Juan Kruze European Hares In Chile: A Different Lagomorph Reservoir For *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis*? Journal Of Wildlife Diseases, 47(3), P. 734–738, 2011.

Sung, N., E M. T. Collins. Thermal Tolerance Of *Mycobacterium Paratuberculosis*. Appl Environ Microbiol 64, P.999-1005, 1998.

Sweeney, R. W. Transmission Of *Paratuberculosis*. Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice, V.12, N.2, P.305-312. 1996.

Whan L. B. Gran I.R. Bactericidal Effect Of Chlorine On *Mycobacterium Paratuberculosis* In Drinking Water.Letters In Applied Microbiology. V.33, N.3, P.227-231, 2001

OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi verificar a presença de MAP na água para consumo humano e animal em propriedades de caprinocultura leiteira da Zona da Mata Mineira e identificar fatores de risco associados à presença de MAP em amostras de biópsias intestinais de humanos.

Os objetivos específicos do estudo envolvem:

- Verificar a presença da bactéria em amostras de água para consumo humano e animal em fazendas produtoras de caprinos leiteiros de região da Zona da Mata mineira, através do cultivo microbiológico e PCR, além de realizar a caracterização dessas propriedades;
- Determinar fatores de risco relacionados à presença de MAP nas amostras de biópsias intestinais de pacientes portadores da doença de Crohn, outras doenças inflamatórias intestinais e não portadores de doenças inflamatórias intestinais, através da aplicação de questionário;
- Realizar uma revisão bibliográfica descritiva dos estudos sobre MAP em países latino-americanos.

CAPÍTULO I

Paratuberculose na América Latina: uma revisão sistemática

Espechit, I.F.; Schwarz, D.G.G.; Faria, A.C.S.; Souza, M.C.C; Paolicchi, F.;
Moreira, M.A.S.

Resumo

América Latina é a definição do grupo de países situados na América e falantes das línguas que tem como origem o latim (espanhol e português), e inclui países da América do Sul, Central e do Norte. A paratuberculose ou doença de Johne, enfermidade crônica contagiosa do trato gastrointestinal, afeta ruminantes domésticos e silvestres e tem como agente etiológico o bacilo Gram-positivo *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP). A doença é caracterizada por diarreia intermitente, queda da produção de leite, desidratação e emagrecimento progressivo. Suspeita-se que a bactéria possa estar envolvida na doença intestinal humana, Doença de Crohn. MAP apresenta resistência a fatores ambientais, processos de pasteurização do leite e desinfecção da água, sendo esses os veículos de transmissão de MAP aos seres humanos. Esse fato, aliado ao caráter subclínico-clínico da doença torna a paratuberculose relevante do ponto de vista socioeconômico e sanitário, justificando a investigação descritiva da situação da doença e das pesquisas nos países latino-americanos. Foi realizado um levantamento de 67 artigos, até janeiro de 2015, nas bases de dados Scopus, Pubmed, Agris, Science Direct, referenciando a detecção de MAP e da doença nos países da América Latina, sem restrições quanto à data das pesquisas. As palavras-chave usadas foram: “paratuberculosis”, “*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*”, “cattle”, “milk”, “wildlife”, “goat”, “ovine”, “dairy”, além do nome de cada país escrito na língua inglesa. Foram encontrados 67 estudos em 9 dos 20 países que compõem a América Latina, sendo 25 artigos referentes ao Brasil, 12 ao Chile, oito à Argentina, cinco à Colômbia, quatro ao México, dois à Venezuela, dois ao Peru, um ao Panamá e um à Bolívia. MAP foi identificado em todos os referidos países. Foi demonstrada a presença entre bovinos, caprinos, ovinos e animais silvestres como lagomorfos e guanacos, e as técnicas mais frequentemente utilizadas o cultivo microbiológico, a PCR e a ELISA. O reduzido número de estudos pode resultar em uma visão sub ou, superestimada da situação real. A maioria dos países tem carência ou ausência de qualquer informação sobre o real comprometimento dos animais e as cepas circulantes, quadro que resulta em desvantagem econômica e

comercial, pois as perdas na produção e o desconhecimento do status sanitário comprometem a exportação de seus produtos. Muitos países estão exigindo a certificação para a comercialização de produtos de origem animal e por isso, em países como os latino-americanos, onde a agropecuária representa uma parcela importante da economia, atenção, no nível de pesquisas e de governos, deve ser dada a doença, pois compromete não somente a economia, mas pode comprometer também a saúde pública.

Palavras Chave: detecção, dairy, *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, leite, PCR, ELISA.

1- Introdução

América Latina é a definição do grupo de países situados na América e que possuem como línguas nativas, aquelas que têm como origem o latim (espanhol e português). Dentre esses países estão, Argentina, Brasil, Chile, Bolívia, Colômbia, Equador Paraguai, Peru, Uruguai, e Venezuela, que pertencem a América do Sul, os países da América Central: Costa Rica, Cuba, El Salvador, Haiti, Honduras, Nicarágua, Panamá, Guatemala e República Dominicana, além do México, pertencente à América do Norte, representados na Figura 1.

A paratuberculose ou doença de Johne é uma enfermidade crônica contagiosa do trato gastrointestinal que afeta ruminantes domésticos e silvestres, cujo agente etiológico é *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) (Chiodini *et al*, 1984; Clarke, 1997; Ayele *et al*, 2001; Mota *et al*, 2010). A doença é caracterizada por diarreia intermitente, redução da produção de leite, desidratação e emagrecimento progressivo (Wu *et al*. 2007). Além de ser uma bactéria Gram-positiva, MAP tem a capacidade de resistir à descoloração com álcool-ácido, sendo assim denominada BAAR (Bacilos Álcool-Ácido-Resistente) (Timms *et al*, 2011). Isso ocorre devido à composição de sua parede celular formada por de lipídeos livres e polipeptídios como micolatos de trealose, manosídeos de fosfatidilinositol (PIMs) e seus derivados glicosilados, lipomananas (LM) e lipoarabinomananas (LAM). Esses compostos contribuem

também para a capacidade de indução de infecção (patogenicidade) pelas micobactérias (Devinder K. *et al*, 2006; Ryan *et al*, 2004), características que permitem à bactéria permanecer no interior de macrófagos e inibir a formação dos fagossomos, limitando, dessa forma, a apresentação dos antígenos às células do sistema imune, resultando em quadro crônico da infecção.

Além do caráter infeccioso, a composição de sua parede é fator importante para resistência no ambiente. MAP pode permanecer viável até 55 semanas em condições favoráveis de umidade e temperatura, MAP pode formar estruturas “spore like” quando essas se tornam desfavoráveis à sobrevivência, como as encontradas em solo e ambientes aquáticos. (Collins, 2003; Lamont *et al*, 2012). Pesquisas têm demonstrado que MAP pode também sobreviver a altas temperaturas e permanecer viável após o processo de pasteurização (Grant *et al*, 2002; Ayele *et al*, 2001; Carvalho *et al*, 2012). Brandt *et al*, (2011) demonstraram ainda que a pasteurização rápida não é tão efetiva na redução dos níveis de MAP em leite cru quanto a pasteurização lenta e com fluxo turbulento.

A primeira descrição da doença ocorreu na Alemanha por Johne e Frothingham (1895), quando isolaram BAAR do intestino de um bovino com enterite granulomatosa crônica. Após subseqüentes alterações taxonômicas, estudos genômicos e fenotípicos, foram demonstradas similaridades de MAP com o complexo *Mycobacterium avium*, onde Thorel *et al*, em 1990, propuseram alteração da nomenclatura desse, para *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, nome aceito e usado até os dias atuais.

Sá *et al* (2013), estudaram fatores de risco para a infecção entre bovinos, e identificaram que taxas anuais de nascimento mais altas estão associadas a ocorrência da doença. De acordo com Zare *et al* (2013) a infecção por MAP também é influenciada de forma sazonal, além da influência da idade dos animais, ocorrendo um pico de infecção ente animais nascidos durante o verão. A taxa anual de reposição dentro do rebanho, vacas infectadas, compra de novilhas infectadas ou a não realização da quarentena de animais recém-adquiridos, além do contato efetivo entre vacas e bezerros, também são considerados fatores de risco para a infecção (Hirst *et al*. 2004).

Também o tipo de criação, manejo sanitário e pluviosidade podem influenciar o aparecimento da enfermidade, já que modificam as condições ambientais, propiciando ou dificultando a multiplicação da bactéria.

A importância da transmissão e infecção de MAP em rebanhos de ruminantes está fundamentada, principalmente, pelo caráter subclínico da doença, de forma que estes animais podem permanecer nessa condição por longos períodos disseminando o agente e diminuindo substancialmente a produção de leite e carne (Johnson *et al*, 2001; Losinger, 2005), além de antecipar o descarte do animal e prejudicar o bem estar desses animais. Desse modo, as perdas econômicas podem variar consideravelmente de acordo com o país. Na América Latina ainda não se têm dados quantificando as reais perdas produtivas provocadas pela paratuberculose. Na Austrália, Bush *et al*. (2006) identificaram em rebanhos de pequenos ruminantes, perdas médias acima de 13 mil dólares fazenda/ano.

Há também a pesquisa de MAP em animais silvestres como na Espanha, Marco *et al*. (2002), que encontraram achados macroscópicos e histopatológicos compatíveis com a paratuberculose em 62,5% dos gamos (fallow deer) livres na natureza, também verificando diarreia, e resultados positivos para o cultivo de MAP, que foram confirmados por PCR em dois dos animais. Também Salgado *et al* (2011), detectaram o agente em lebres selvagens no sul do Chile e, em 2009 o mesmo grupo de pesquisadores, foi responsável pelo primeiro relato do isolamento de MAP em guanacos selvagens no país.

Além da importância econômica, a associação de MAP com a doença de Crohn (DC) é uma preocupação. A DC é uma inflamação crônica do intestino humano que acomete frequentemente o íleo e o cólon (Crohn *et al*, 1932), mas pode comprometer qualquer segmento do tubo digestório. Acredita-se que MAP possa ser um agente infeccioso relacionado à DC, devido às similaridades clínicas e histopatológicas encontradas em pacientes com a doença e animais com paratuberculose (Ilsi, 2004; Ormaechea *et al*, 2009), além do frequente isolamento de MAP de amostras provenientes de pacientes

acometidos pela DC, o que indicaria um problema em saúde pública para a população exposta aos animais com paratuberculose e à produtos contaminados com MAP (Bull *et al*, 2003; Wagner *et al*, 2011).

Já na Europa as pesquisas são diversas como Nielsen *et al*, (2009) pesquisaram os relatos da doença em bovinos no período de 1990-2008, encontrando uma prevalência média de 20% nesses animais, não havendo encontrado informações sobre a doença em caprinos e ovinos nas fontes pesquisadas.

Na América Latina, aproximadamente 33 milhões de pessoas possuem a agricultura como sua principal ocupação e cerca de oito milhões estão distribuídos em áreas urbanas. Juntos, representam 25% de toda a população economicamente ativa.

A maioria dos países latino-americanos tem carência de informações sobre o real comprometimento dos animais e informações acerca das cepas circulantes, quadro que resulta em desvantagem econômica e comercial, pois as perdas na produção e o desconhecimento do status sanitário comprometem a exportação de seus produtos. Muitos países estão exigindo a certificação de ausência de MAP em rebanhos para a comercialização de animais e produtos de origem animal e por isso, países como os latino-americanos, onde a agropecuária representa uma parcela importante da economia, atenção a nível de pesquisas e de governos, deve ser dada a essa doença, pois compromete não somente a economia, mas também a saúde pública.

Dados sobre a prevalência da doença na América Latina como um todo não foram encontrados, e para alguns países da mesma nenhum dado foi encontrado acerca da doença, justificando a reunião dos dados encontrados sobre cada país nesse artigo, provendo uma visão ampla da situação da doença nessa região. Não foram encontrados outros trabalhos tratando da revisão sistemática sobre a paratuberculose na América Latina.



Figura 1- Mapa representando os países latino-americanos* Fonte: <http://4.bp.blogspot.com/--wP54Gspokk/T0D24HFA03I/AAAAAAAAKOW/quCvIhv4bL0/s400/latiname.gif>
*os países não nomeados no mapa tratam-se de países não falantes de línguas de origem latina e portanto não integram a América Latina.

2- Métodos

Foram encontrados 67 artigos, até janeiro de 2015 nas bases de dados Scopus, Pubmed, Agris, Science Direct, referenciando a detecção de MAP e da doença nos países da América Latina, sem restrições quanto à data dos estudos. Apenas artigos publicados em revistas internacionalmente indexadas foram incluídos na revisão, sendo descartados aqueles provenientes de

literatura local, também denominada 'gray literature', não indexadas internacionalmente.

As palavras-chave para esse levantamento foram: “*paratuberculosis*”, “*Mycobacterium avium ssp.. paratuberculosis*”, “cattle”, “wildlife”, “goat”, “ovine”, “dairy”, além do nome de cada país escrito na língua inglesa. Foram encontrados estudos em 9 dos 20 países que compõem a América Latina, sendo 27 artigos referentes ao Brasil, 13 à Argentina 12 ao Chile, cinco à Colômbia, quatro ao México, dois à Venezuela, dois ao Peru um ao Panamá e um à Bolívia.

Também foram considerados para caracterização dos países dados de órgãos governamentais

Em cada artigo foram observados: espécie animal em questão, número de animais, objetivo o estudo técnicas utilizadas e resultados.

3- Resultados e discussão

A tabela 1 apresenta as pesquisas encontradas sobre MAP nos países da América Latina, incluídas na revisão. A ordem apresentada está em ordem decrescente quanto ao número de estudos encontrados nos países

Tabela 1- Sumarização dos trabalhos incluídos na revisão.

País	Espécie	Objetivo do estudo	Técnicas utilizadas	Autor
Brasil	Caprinos e ovinos	Relatar as enfermidades digestivas diagnosticadas no Hospital Veterinário	Investigação histórica de casos clínicos	De Lira <i>et al.</i> (2013)
Brasil	Diversas	Reunir informações epidemiológicas, clínico-patológicas e laboratoriais da doença no país	Diversas	Yamasakiet al. (2013)
Brasil	Bovinos	relatar os aspectos epidemiológicos da infecção por MAP em bovinos leiteiros de Garanhuns-PE	Sorologia (ELISA), questionário investigativo	Sá <i>et al.</i> (2013)

Brasil	Bubalinos	Caracterizar um surto na região sul do país	Sorologia (ELISA), cultura, PCR e imunohistoquímica	Dalto et al. (2013)
Brasil	Caprinos e ovinos	Estimar a frequência de anticorpos em animais, na Paraíba	Sorologia (ELISA) e cultura	Medeiros et al (2012a)
Brasil	Bovinos	Realizar investigação sorológicas em rebanhos com e sem histórico da doença	Sorologia (ELISA)	Medeiros et al. (2012b)
Brasil	Bovinos (leite comercial)	Investigar a presença de MAP em amostras de leite comercial	Cultura, Nested-PCR e sequenciamento Genético	Carvalho et al. (2012)
Brasil	Bovinos	Verificar a conservação genética das sequencias usadas de <i>IS900</i> para diagnostico em leite cru	PCR, sequenciamento genético e bioinformática (polimorfismo)	Carvalho et al. (2012)
Brasil	Bovinos	Reportar aspectos anatomopatológicos de três animais positivos, no Rio de Janeiro-RJ	Sorologia (ELISA) e histopatologia	Rodrigues et al. (2012)
Brasil	Bovinos	Avaliar a eficiência da proteína recombinante de MAP, APA em testes sorológicos	Cultura celular, imunofluorescencia, Imunohistoquímica e sorologia (ELISA)	Souza et al. (2011)
Brasil	Bubalinos	Investigar e caracterizar a paratuberculose e suas alterações clínico-patológicas, nessa espécie em Pernambuco	Histopatologia, exame de Ziehl-Nilseen em fezes e PCR	Mota et al. (2010)
Brasil	Caprinos e ovinos	Relatar a ocorrência nessas espécies no Nordeste do país e caracterizar as alterações clínico-patológicas	Teste intradermoreação e histopatologia	Oliveira et al. (2010)
Brasil	Bovinos	Avaliar a eficiência de duas proteínas recombinantes de <i>M.bovis</i> (MPB70 e MPB83) em testes sorológicos para diferenciar infecções por MAP e por <i>M.bovis</i>	Sorologia (ELISA)	Marassiet al. (2010)
Brasil	Bovinos	Investigar a presença de MAP em rebanhos leiteiros em Viçosa-MG	PCR e sequenciamento genético	Carvalho et al. (2009)

Brasil	Bovinos	Reportar os aspectos clínicos, anatomo-patológicos, num rebanho leiteiro da Paraíba	Histopatologia e cultura	Mota <i>et al.</i> (2009)
Brasil	Bovinos	Avaliar a interferência da tuberculinização nos testes de ELISA	Sorologia (ELISA) e cultura	Varges <i>et al.</i> (2009)
Brasil	Diversas	Fazer uma revisão da doença	Diversas	Lilenbaum <i>et al.</i> (2007)
Brasil	Bovinos	Relatar o surto da doença	Sorologia (ELISA e AGID), histopatologia e cultura	Ristow <i>et al.</i> (2007)
Brasil	Bovinos	Avaliar três diferentes formulações de meio HEYM em quatro protocolos de cultura fecal	Cultura	Ristow <i>et al.</i> (2006)
Brasil	Diferentes espécies	caracterizar um novo loci (VNTR-MIRU) no genoma de MAP em isolados de MAC da América do Sul	Cultura, RFLP, PCR e Tandem Repeat	Romano <i>et al.</i> (2005)
Brasil	Bovinos	Padronizar teste ELISA in house para utilizar no território nacional	Sorologia (ELISA)	Marassiet <i>et al.</i> (2005)
Brasil	Bovinos	Avaliar a técnica de AGID e sua aplicabilidade no campo	Sorologia (ELISA e AGID)	Ferreira <i>et al.</i> (2002a)
Brasil	Bovinos	Avaliar sorologicamente o melhor teste para detecção em rebanhos no Rio de Janeiro-RJ	Sorologia (ELISAs)	Ferreira <i>et al.</i> (2002b)
Brasil	Bovinos	Descrever o quadro clínico-patológico de animais acometidos	Histopatologia e cultura	Driemeier <i>et al.</i> (1999)
Brasil	Bovinos (queijo)	Detectar MAP em amostras de queijo coalho	Cultura e PCR	Faria <i>et al.</i> (2014)

Brasil	Bovinos	Fazer um levantamento da ocorrência de MAP em um Estado brasileiro	ELISA	Costa et al (2010)
Brasil	Bovinos	Deteção agente em um Estado brasileiro	ELISA	Fonseca et al (1999)
Chile	Bovino	Avaliar o poder de deteção da técnica de PMS-PCR em comparação à cultura	Cultivo e PMS-PCR	Salgado et al (2013)
Chile	Veados vermelho	Deteção de MAP em rebanhos de veados vermelho	Cultivo, PCR, baciloscopia e análise macroscópica	Pradenas et al (2014)
Chile	Bovinos	Deteção de MAP em amostras ambientais de fezes e em amostras de leite de tanque de resfriamento	PCR e cultura	Kruze et al (2013)
Chile	Bovinos e lebres	Comparação da ocorrência de MAP entre bovinos e lebres selvagens capturadas próximas aos rebanhos bovinos	Cultura e PCR	Salgado et al, 2014
Chile	Caprinos, pseudoruminantes, lebre europeia	Revisão sobre a doença em caprinos chilenos	Diversas	Kruze et al. 2007
Chile	Bovino	Avaliar a especificidade e sensibilidade de diferentes técnicas na deteção de MAP	Sorologia (ELISA), cultivo, baciloscopia, PCR	Soto <i>et al.</i> (2002)
Chile	Bovinos	Avaliar a validade e o custo do exame de amostras individuais e em pool para a deteção de MAP	Cultivo	Schaik et al. (2007) a
Chile	Bovinos	Análise comparativa da efetividade da deteção de MAP por cultivo e ELISA para a validação de um teste de ELISA	Sorologia (ELISA), cultivo, PCR	Schaik et al. (2007)b
Chile	Caprinos	Notificar primeiro caso com isolamento de MAP em caprinos leiteiros no Chile	Sorologia (ELISA), cultivo e necropsia	Kruze et al. (2006)

Chile	Caprinos	Determinar a acurácia de um teste de ELISA na detecção de MAP em soro e leite	Sorologia (ELISA) e cultura	Salgado <i>et al.</i> (2007)
Chile	Guanacos selvagens	Detecção da infecção por MAP em vida selvagem em região com doença de Johnne documentada	Cultivo, PCR, PCR com restrição por endonuclease	Salgado <i>et al.</i> (2009)
Chile	Lebres selvagens	Identificação de MAP em lebres selvagens que habitam região com doença de Johnne documentada	Histopatologia, baciloscopia e cultivo	Salgado <i>et al.</i> (2011)
Argentina	Bovinos	Investigar a prevalência de Paratuberculose no país	Sorologia e estudos anteriores	Moreira <i>et al.</i> (1994)
Argentina	Caprinos	Primeiro relato de MAP em caprinos	Isolamento de fezes e leite	Ubach <i>et al.</i> (1941)
Argentina	Bovinos e Cervos	Técnica RFLP para comparar amostras de MAP com cepas Europeias	RFLP	Paolicchi <i>et al.</i> (1999)
Argentina	Cervos	Detecção de MAP em Cervos e análise imunohistoquímica de amostras	Isolamento, coloração, imunohistoquímica	Paolicchi <i>et al.</i> (2001)
Argentina	Queijo caprino e ovino	Detecção de MAP em queijos caprinos e ovinos	Cultura e coloração Ziehl-Neelsen	Cirone <i>et al.</i> (2006)
Argentina	Bovino (leite comercial pasteurizado)	Investigar a presença de MAP em amostras de leite comercial pasteurizado	PCR, cultura, seqüenciamento genético	Paolicchi <i>et al.</i> (2012)
Argentina	Caprinos	Primeiro isolamento de MAP em cabras	Cultura, PCR, exame patológico, sorologia	Fiorentino <i>et al.</i> (2012)
Argentina	Bovinos	Diferenças, vantagens e desvantagens de diferentes tipos de diagnósticos para MAP	Diagnóstico direto, molecular, histopatologia, resposta imune humoral, paratuberculose clínica e subclínica	Gilardoni <i>et al.</i> (2012)

Argentina	Nenhuma	Avaliação de um derivado protéico de uma cepa de MAP argentina	Sorologia, liberação yIFN bovino, análises estatísticas	Gioffré et al. (2012)
Argentina	Bovinos	Diferentes métodos de diagnóstico para MAP em bovinos no país	Sorologia, Cultura, PCR, teste Tuberculina,	Paolicchi et al (2013)
Argentina	Llama	Diagnóstico de uma Llama apresentando sinais clínicos clássicos de Paratuberculose	Ziehl-Neelsen, cultura, PCR	Jorge et al. (2008)
Argentina	Bovinos	Presença de MAP em alimentos e relação com DC	Revisão	Cirone et al. (2007)
Argentina	Bovinos	Detecção de isotipos IgG bovinos em Elisa – PPA de bovinos infectados com doença de Johne	Sorologia	Fernández et al. (2012)
Colômbia	Bovinos	Detecção e comparação de 3 testes diagnósticos	Sorologia (ELISA), cultivo e PCR	Fernandez-silva et al. (2005)
Colômbia	Bovinos	Detecção e caracterização das cepas encontradas	Sorologia (ELISA), cultivo, PCR e ISSR	Fernandez-silva et al. (2011)
Colômbia	Bovinos	Detecção de MAP em um rebanho	Intradermorreação com tuberculina aviária e sorologia (ELISA)	Waard (2010)
Colômbia	Bovinos	Detectar possíveis casos de paratuberculose documentados para um rebanho e seus elementos	(retrospectivo) dados sobre prova de intradermorreação, necropsia, histopatologia e alterações clínicas	Ramirez et al. (2011)
Colômbia	Diversas	Revisar a ocorrência da paratuberculose na colômbia	Diversas	Restrepo et al. (2008)
México	Caprinos	Investigar a presença de MAP em cabras leiteiras	ELISA indireto	Martinez-Herrera et al. (2012)

México	Caprinos e ovinos	Realizar análise descritiva dos casos de paratuberculose ovina e caprina recebidos para diagnóstico em um laboratório	ELISA	Méndez et al. (2008)
México	Ovinos	Investigar a presença de MAP em ovinos	Nested-PCR e imunodifusão em gel de ágar	Morón-Cedillo et al. (2013)
México	Bovinos e caprinos	Investigar a presença de MAP em amostras de leite de bovinos e caprinos	Isolamento, sorologia (ELISA indireto), PCR	Favila-Humara et al. (2010)
Peru	Bovinos	Identificar a presença de MAP na região de Lima por 3 técnicas diagnósticas	Prova de intradermorreação à tuberculina aviária	Bustamante et al. (2011)
Peru	Bovinos	Notificar o primeiro isolamento de MAP no Peru	Baciloscopia, Cultivo, Sorologia (ELISA) e PCR	Ortiz et al. (2009)
Venezuela	Bovinos	Verificar o comprometimento de bovinos crioulos limoneros	Sorologia (ELISA), cultura, histopatologia, hematologia e PCR	Sánchez-Villalobos et al. (2009)
Venezuela	Bovinos	Verificar a presença de MAP em leite pasteurizado	PCR e cultura	Méndez et al. (2006)
Bolívia	Veados cinza	Verificar a presença de diversos agentes, inclusive MAP	Imunodifusão	Deem et al. (2004)
Panamá	Bovinos	Avaliar o uso de amostras de plasma quando comparada ao uso de amostras de soro para detecção de MAP em bovinos	ELISA	Goodridge et al, 2013

Brasil

É o maior país da América do Sul com área total de mais de 8 515 767 km² situado entre os paralelos 5°16'19" de latitude norte e 33°45'09" de latitude sul e entre os meridianos 34°45'54" de longitude oeste e 73°59'32" de longitude oeste. Possui o seu litoral banhado pelo oceano Atlântico e grande extensão

territorial fazendo fronteira com dez países. Com exceção do Chile e do Equador, todos os países da América do Sul fazem fronteira com o Brasil. O Brasil é o quinto maior país do planeta em extensão territorial. Essa característica associada ao clima tropical permite a criação do gado em pastagens, o que possibilita estratégias de incremento na produtividade.

A pesquisa do efetivo do número de animais no Brasil entre 2010 e 2011 revelou crescimento significativo para os bubalinos (7,8%), bovinos (1,6%), ovinos (1,5%), suínos (0,9%) e caprinos (0,7%) (IBGE, 2011).

Segundo dados internacionais do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, até o final do primeiro semestre de 2013, o Brasil se consolidou como detentor do segundo maior rebanho bovino efetivo do mundo. A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial e se subdividem em dois grandes segmentos, a cadeia produtiva de carne e a do leite. Além da carne bovina, o Brasil se destaca como o sexto maior produtor mundial de leite.

Já quanto à importação o país adquire da Argentina e Uruguai, insignificantes volumes de leite fluido para suprir interesses comerciais.

No Brasil, a paratuberculose foi identificada em 1915 por Octávio Dupont por meio do “Jornal do Commercio” em bovinos importados da Bélgica para o Rio de Janeiro. Nesse ponto, relacionou-se a uma doença exclusivamente exótica acometendo apenas rebanhos de animais importados. No entanto, Darcorso Filho *et al.* (1960) identificaram a doença em bovinos nascidos e criados no Brasil e somente em 2007 o agente foi isolado em rebanho de bovinos leiteiros nativos do país (Ristow *et al.* 2007). Esse fato instigou pesquisas que já em 2009 realizaram a primeira detecção molecular de MAP por Reação em cadeia da polimerase (PCR), em amostras de leite cru (Carvalho *et al.* 2009).

A maioria dos estudos publicados no Brasil utilizam métodos sorológicos para o diagnóstico, seguido do uso de técnicas microbiológicas. Um estudo avaliou o teste de Imunodifusão em ágar gel (AGID) em 48 amostras de soro de 1004 animais provenientes de 45 rebanhos leiteiros do Estado do Rio de Janeiro, onde , foi comprovado que a utilização AGID teve baixa sensibilidade

(57%) e especificidade (92,5%). Desse modo, a utilização dessa técnica se torna eficiente, apenas, para confirmar a positividade de animais suspeitos e não para determinar um padrão de busca ativa em rebanhos subclínicos (Ferreira et al.2002a). No entanto, a utilização de um “ELISA in house”, testados em 179 bovinos leiteiros, com antígeno protoplasmático da paratuberculose (ELISA-PPA) demonstrou ser adequado para a sua utilização no diagnóstico de rebanhos suspeitos (Ferreira et al. 2002b). A utilização conjunta das ferramentas moleculares e sorológicas, associadas às alterações macro e microscópicas e técnicas histopatológicas permitiu, recentemente, a detecção de MAP em rebanhos de búfalos d’água no Sul do Brasil. Embora seja relatado que essas espécies apresentam menor suscetibilidade à infecção que os bovinos, dentre 203 animais, sete apresentaram alterações clínico patológicas, 21 reações positivas por ELISA e oito morreram. De acordo com os autores, foi possível inferir que a prevalência desse rebanho avaliado é alta. Não se sabe a razão desse comportamento, mas sugere-se que o comportamento de amamentação desses animais associados ao manejo intensivo pode contribuir para a maior positividade dos animais (Dalton,et al, 2012).

Os métodos para determinar a real situação da paratuberculose em diferentes estados brasileiros ainda são fundamentados em diferentes metodologias, apresentando resultados que não possibilitam uma avaliação real do panorama do país. Contudo, estudos revelaram uma prevalência de 37,9% em 40 animais testados no Estado de São Paulo (Fonseca et al, 1999), 30% de 128 vacas no Estado do Rio de Janeiro (Ristow et al, 2007), 60,24% de 166 amostras de soro sanguíneo, em Goiânia (Acypreste et al, 2005), 45,51% no Mato Grosso do Sul (Rivera, 1996) e, no Espírito Santo, Costa et al. (2010) fizeram um levantamento sorológico em 1450 vacas leiteiras e constataram positividade em 11,4% dos animais.

Embora não se tenham muitos estudos acerca da distribuição de cepas de MAP no país, foi verificado que o polimorfismo da sequência *IS900* de diferentes cepas de MAP é altamente conservada, sendo e adequada para o uso em diagnósticos moleculares (Carvalho et al. 2012). Nesse sentido,

recentemente Faria et al. (2014) conseguiram detectar a presença de DNA de MAP em 10% (3/30) das amostras de queijo Coalho de varejo no município de Parnaíba-PI. Em 3,3% (1/3) dessas amostras, foi possível recuperar células viáveis, cultivadas em meio HEYM. Os resultados desse trabalho possuem grande relevância para o Brasil, pois, além de ser o primeiro relato da detecção de MAP em queijo no país, dificilmente conseguiu-se comprovar a sua viabilidade em queijos.

Em caprinos e ovinos do Nordeste do Brasil, Oliveira et al. (2010) comprovaram por histopatologia e coloração para detecção dos BAAR, a presença de MAP em animais naturalmente infectados. Ainda nesse mesma região, um estudo sorológico revelou que a frequência de pequenos ruminantes infectados foi de 44,96% de 734 amostras de soro de caprinos e 54,08% de 392 de ovinos, assintomáticos, proveniente de 46 rebanhos diferentes (Medeiros et al, 2012).

Assim como na espécie bovina, a paratuberculose caprina e ovina não é amplamente investigada no país. Embora o número de trabalhos tenha aumentado nos últimos anos, o Brasil ainda tem carência de informações do real comprometimento dos animais e as cepas que circulam no país. Esse quadro leva a desvantagem econômica e comercial, pois as perdas na produção e o desconhecimento do status sanitários dos animais brasileiros pode comprometer a exportação de produtos originários desses rebanhos (Schwarz et al. 2012).

A importante representatividade comercial do Brasil no mercado agropecuário mundial implica a utilização de medidas sanitárias efetivas nos rebanhos nacionais e o aprimoramento de investigações de doenças animais, a fim de garantir a qualidade dos produtos. Embora exista carência de estudos sobre o impacto da paratuberculose nos rebanhos nacionais, tem-se aumentado as exigências dos países importadores acerca do status sanitários dos animais como livres da doença.

Argentina

A Argentina, situada sob as coordenadas 34° 00' S, 64° 00' W, faz fronteira com o Brasil, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Chile, e possui o quinto maior rebanho do mundo com uma extensa produção de produtos cárneos e lácteos, sendo, o Pampa, a maior região criadora de gado do país. O país conta com mais de 45 milhões de cabeças de gado segundo o Servicio Nacional De Sanidad Y Calidad Agroalimentaria (SENASA) em 2010. Nos últimos anos, a produção pecuária argentina passou por grandes crises na exportação e produção interna ocasionadas por eventos climáticos adversos (SENASA 2010). As exportações de carne na Argentina caíram em 2012 cerca de 29,1% em todos os destinos, exceto no Chile, que houve um crescimento de 4,8% na importação de carnes argentina (SENASA 2012).

Os principais países e importadores da carne argentina são Israel, Alemanha e Chile. Nos últimos meses de 2012 a Argentina totalizou 11.450 toneladas de carne exportada (SENASA 2012).

Além do mercado de bovinos de corte a Argentina produziu em 2011 um total de 11.600 milhões de litros de leite e exportou 2.800 milhões do produto, sendo 8.800 de litros restantes destinados para consumo próprio do país. Como destino para a exportação de produtos lácteos, a Argentina conta com 107 países, entre eles, Brasil (22%), Venezuela (22%) e Argélia (13%) (Instituto De Promoción De La Carne Vacuna -IPCVA 2012).

Estima-se que as perdas econômicas na província de Buenos Aires devido a paratuberculose cheguem aos 22 milhões de dólares para produção de gado de corte e 6,3 milhões para gado leiteiro. (Moreira et al, 1994; Moreira e Tosi, 1995).

Algumas regiões do país mostraram soroprevalência para MAP que variam de 7 – 19,6% em rebanhos de criação, segundo dados do Instituto Nacional De Tecnologia Agropecuária (INTA, 2012). A alta prevalência da doença na Argentina e a possível correlação do agente etiológico da paratuberculose com a DC sugere a utilização de medidas sanitárias mais rigorosas e testes para exportação e importação de animais, mesmo que

sadios. Outra suspeita na transmissão de MAP para os seres humanos é via alimentos derivados do leite bem como a água contaminada pelos animais, o que alerta ainda mais para a melhora nas medidas sanitárias destes alimentos (Cirone et al 2007).

Segundo Paolicchi et al. (2002) além do teste padrão ouro para detecção de MAP em meio de cultura HEYM, o teste sorológico ELISA é muito importante pela sua sensibilidade para diagnosticar a doença. Dessa forma, para estabelecer o estágio da doença, deve-se fazer dois ou três testes, em um mesmo animal para a detecção ainda em fase subclínica ou silenciosa, o que seria a chave para o início de programas de controle da doença, sendo, assim, estabelecidas algumas normas de segurança (Paolicchi et al, 2012). Isso visto que em um estágio inicial da doença na forma subclínica, MAP pode ser eliminado através do leite, mesmo que os testes sorológicos sejam negativos (Paolicchi et al, 2001).

Com base na dificuldade para detecção de MAP em animais que se encontram em estágio subclínico da doença devido à baixa concentração do agente eliminados pelas fezes e pela dificuldade em detectar anticorpos específicos para MAP, Fernández (2012) testou a desempenho dos isotipos de imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG2 em teste imunológico ELISA – PPA para diversos bovinos em estágios diferentes da doença. O estudo mostrou que a combinação de IgG e IgG2 pode melhorar a detecção de MAP em bovinos durante os diferentes estágios da doença.

Já em 2011, foi publicado o primeiro isolamento e detecção de MAP a partir de leite comercial pasteurizado na Argentina, indicando o risco para a população quando consumidos tais produtos (Paolicchi et al, 2011).

O primeiro isolamento e caracterização molecular de MAP em cabras foi então realizado na Argentina em 2012 por PCR e PCR-REA como técnica molecular e cultura em meio Herrold gema de ovo (Fiorentino et al, 2012). Considerando a presença de MAP em leite bovino e caprino, Cirone (2006) alerta a importância da maturação de queijos elaborados com leite bovino e caprino sem tratamento térmico a fim de diminuir a presença de MAP e outros organismos melhorando a qualidade higiênico-sanitária do alimento.

Não foram encontrados outros dados oficiais sobre o avanço dos estudos em relação à Paratuberculose ou Doença de Johne, embora a Argentina seja um país com grandes avanços científicos frente à pesquisa do agente etiológico da Paratuberculose

Chile

O Chile, localizado na região sudoeste da América do Sul, sob as coordenadas geográficas 30 00S, 71 00W, faz limites com o Peru e a Bolívia ao norte e com a Argentina ao leste, além dos oceanos Pacífico e Atlântico.

Sua economia é uma das mais importantes do continente, sendo o setor agropecuário, responsável por empregar boa parte da população, e por uma parcela importante do PIB, chegando a 5% do total, em 2000 e representando 9,3% do valor das exportações no mesmo ano. (Ministerio Da Agricultura Del Chile, 2006)

No país a população bovina é de quase 4 milhões, enquanto a caprina de aproximadamente 700 mil cabeças, (Kruze *et al* 2007)

A paratuberculose encontra-se bem documentada no país, tendo sido reportada no país pela primeira vez por Grinbergs e Caorsi (1958) na região de Valdivia em bovinos e em pequenos ruminantes. Foi também descrita por Zamora e colaboradores (1975) em ovinos, na mesma região. Também foi descrita no país em rebanhos de caprinos leiteiros, em 2002 e em 2006.(Kruze *et al*, 2007).

No estudo de Soto *et al*, 2002, foram analisados 14 rebanhos bovinos, totalizando 250 animais, dos quais amostras de soro e fezes foram coletadas e submetidas aos testes de ELISA, cultivo microbiológico, baciloscopia direta (ZN) e confirmação por PCR. Pela técnica do cultivo, o micro-organismo foi isolado de um total de 5 (71,4)% dos rebanhos e 16% dos animais, enquanto ao ELISA, 8% dos animais foram positivos. O número de animais positivos por rebanho flutuou entre 5 e 66,7%.

Já o estudo de Schaik *et al*, (2007a), investigou a presença de MAP em 600 animais, provenientes de 12 rebanhos bovinos chilenos, dos quais

coletou-se amostras de fezes, que foram submetidas ao cultivo microbiológico, obtendo-se resultados positivos em 83% dos rebanhos e 7% dos animais. Nesse estudo os autores também realizaram a cultura das amostras em pools de cinco e 10 animais, e notaram que a sensibilidade do teste em relação ao cultivo individual foi de 46 e 48%, não diferindo estatisticamente com relação ao tamanho do pool. O cultivo das amostras em pool é uma ferramenta útil na redução dos custos dos testes, porém em rebanhos com baixa carga do micro-organismo pode haver um efeito de diluição de MAP, causando resultados falso-negativos. Também foi realizado um estudo por Schaik *et al*, (2007b.) em 27 rebanhos do sul do Chile, totalizando 1333 bovinos, dos quais foi coletado soro e fezes, que também foram submetidos ao cultivo microbiológico e ao ELISA. Os resultados positivos ao cultivo foram submetidos a PCR para confirmação da identidade do micro-organismo, sendo que houve 54 resultados positivos a cultura, o que corresponde a 4,1% dos animais testados em 37% dos rebanhos, enquanto ao teste sorológico obteve-se 86 resultados positivos, correspondendo a 6,4% dos animais

Ainda utilizando amostras fecais de bovinos, Salgado *et al* (2013), encontraram 74.9% (263/351) de amostras positivas ao PMS-PCR e apenas 12.3% (43/351) ao cultivo microbiológico.

Com relação à detecção de MAP em rebanhos caprinos no Chile, três estudos foram analisados. Um deles foi o estudo de Kruze *et al*, em 2006 que analisou um rebanho de 41 animais, avaliados por ELISA e ao cultivo. Ao ELISA 22% dos animais, ou seja, nove amostras de soro foram positivas, além de cinco amostras de leite, que correspondem a 12% dos caprinos testados. Já ao cultivo, foi isolado MAP de seis amostras, ou 14,6% dos animais. Em um dos rebanhos, um animal com sinais clínicos compatíveis com a paratuberculose foi eutanasiado e submetido à necrópsia. O caprino apresentava emaciação severa e à análise histopatológica de amostras de nódulo linfático mesentérico e tecido intestinais, detectou-se a presença de alterações compatíveis com a doença, inclusive a presença de granulomas em nódulos linfáticos mesentéricos, apesar de não ter sido visualizada a presença de bacilos álcool-ácido resistentes.

Outro estudo com relação a caprinos foi o de Salgado *et al* (2007), onde amostras de soro, leite e fezes de 383 caprinos de oito rebanhos foram testadas também ao cultivo e ao ELISA. Das amostras de soro, 66 (16,8%) foram positivas ao ELISA de amostras do soro, enquanto 37(9,4%) foram positivas das amostras de leite, além de 35 (9,4%) amostras que exibiram o crescimento de MAP em meio de cultivo, detectado em 50% dos rebanhos. Os resultados do ELISA utilizando soro e leite foram estatisticamente diferentes, de forma que a sensibilidade do teste com amostras de soro foi significativamente superior.

Kruze *et al* (2013) realizaram um estudo utilizando amostras de tanque de resfriamento e amostras ambientais de instalações de bovinocultura leiteira no sudeste do país, sendo calculando uma prevalência média de 27% para as amostras fecais ambientais e de 49% das amostras de leite do tanque de resfriamento.

Estudos com caprinos confirmam a presença, manutenção e circulação de MAP nos rebanhos chilenos, e destacam a ausência de programas de controle e erradicação da doença.

No estudo de Pradenas *et al* (2014) foi descrita a presença de MAP entre rebanhos de veados vermelhos, criados no país para o consumo de carne. O estudo incluiu achados macroscópicos e microscópicos da doença, além de cultivo microbiológico e PCR.

Além dos estudos sobre MAP em ruminantes, o agente já foi detectado em animais selvagens no Chile. Salgado *et al* (2009), foi responsável pelo primeiro relato do isolamento de MAP em guanacos selvagens no Chile. Esses animais que possuem uma população de 86 mil animais no país, foram provenientes da região da ilha de Tierra Del Fuego, onde 501 animais foram analisados a partir do cultivo microbiológico, confirmado com PCR e tipificadas as cepas, através PCR com restrição por endonuclease, que fornece a tipificação da cepa em de origem bovina, ovina ou intermediária. Ao cultivo, 21 (4,2%) das amostras foram positivas e todas pertenciam ao mesmo grupo genético o C-type, isolado típico de bovinos. Outro fato importante destacado pelo estudo foi de que todos os isolados cultivados eram provenientes de

regiões geográficas próximas e contínuas, situadas próximas a fazendas de gado bovino.

Salgado *et al* (2011), publicaram sobre a detecção de MAP em lebres selvagens na região sul do país, onde os animais habitam próximo a rebanhos bovinos conhecidamente infectados pela bactéria. Os animais da espécie *Lepus europaeus* foram capturados e foram coletadas, fezes, tecido linfático e íleo, sendo submetidos à cultura, baciloscopia direta e análise histopatológica. Histologicamente os tecidos possuíam aparência normal, sem demonstrar nenhum sinal de inflamação. Apesar disso, MAP foi isolado de 48 (12,6%) das amostras de tecido e de 16(4,2%) das amostras de fezes, calculando-se uma prevalência de 14,1% de MAP no rebanho. Esses achados indicam que a lebre europeia atua principalmente como um veículo do micro-organismo , sem desenvolver a doença. Posteriormente o mesmo grupo realizou um estudo onde foram coletadas cerca de 50 lebres em cada uma de duas regiões de rebanhos leiteiros. Realizada a detecção de MAP nas lebres e nos animais dos rebanhos, foi demonstrada associação estatística entre os resultados encontrados entre as lebres e os rebanhos correspondentes. (Salgado *et al*, 2014)

Essas pesquisas não apresentam evidências de quando ou como esses animais foram infectados, porém a proximidade dos rebanhos de bovinos conhecidamente infectados ou potencialmente expostos, com as regiões que os animais selvagens estudados habitam, e a identificação de cepas típicas de bovinos sugerem que a introdução de MAP nessas populações de pseudoruminantes e lagomorfos deu-se através do contato com os animais domésticos.

Apesar de os resultados obtidos no estudo com a população de lebres não indicarem o desenvolvimento da doença nesses animais, a ausência de programas de controle perante a presença confirmada de MAP nos rebanhos bovinos, caprinos e ovinos, representa um risco aos animais silvestres expostos, nos quais o desenvolvimento da forma clínica da doença não foi confirmado, mas é passível de ocorrer.

Colômbia

A Colômbia, segundo país sulamericano mais populoso, com mais de 45 milhões de pessoas, possui fronteiras com o Mar das Caraíbas, Venezuela, Brasil, Peru, Equador e Panamá. Além do território continental localizado sob as coordenadas 4 00 N, 72 00 W ao norte da América do Sul, o país possui dois territórios insulares, San Andrés e Providências, no Mar das Caraíbas, e a ilha de Malpelo, no Pacífico.

A economia da Colômbia baseia-se nas atividades de mineração e agropecuária. O país é um importante produtor de carne bovina, ocupando o 15º lugar na produção mundial em 2003, Segundo o Ministerio da Agricultura e Desenvolvimento Rural (Espinal *et al*, 2005; M.A.D.R. 2012), a população bovina do país foi estimada pelo órgão em 26,8 milhões de cabeças, concentrados nas regiões de Meta, Atioquia e Córdoba, onde podem ser encontrados quase 30% dos animais (Espinal *et al*, 2005; M.A.D.R. 2012).Praticamente toda a produção de carne é destinada ao consumo interno, sendo que as exportações representam menos de 1% do valor e as importações representam perto de 0,4% do consumo nacional.(M.A.D.R. 2012)

O país é quase autossuficiente na produção leiteira, tendo importado aproximadamente 18 mil toneladas de leite entre janeiro e agosto de 2012, provenientes, de acordo com o Ministério da Agricultura, principalmente da Argentina e Chile. As exportações de leite na Colômbia por sua vez, ainda segundo o informativo do Ministério da Agricultura da Colômbia de novembro de 2012, estão sofrendo um processo de contração, chegando a uma queda de 66% em volume, no ano de 2011, sendo os principais destinos do produto a Venezuela e o Equador. Também segundo esse informativo, de janeiro a agosto de 2012, as exportações do produto configuraram um total de 449 toneladas, o que representa uma queda de 9% no volume exportado com relação ao mesmo período do ano anterior. (M.A.D.R., 2012).

Apesar da importância da produção leiteira no país, Restrepo *et al*, (2008) relata a inexistência de programas de controle e erradicação da paratuberculose no país. Segundo o autor, a doença foi diagnosticada pela

primeira vez em território colombiano, no ano de 1924, na fazenda “El Hato”, em Usme. Desde então casos tem sido relatados pelo ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) na região de Meta e também em Antiquia (Restrepo *et al*, 2008).

Mesmo em vista da confirmação da presença da doença em rebanhos colombianos, não são documentados no país, estudos epidemiológicos sobre a incidência, prevalência ou distribuição da doença, os estudos que se têm são escassos, muitas vezes publicados em periódicos locais, baseados em estudos de casos clínicos isolados e amostragens reduzidas. Além disso, dados como o status imune, genética, sexo e idade dos animais usualmente não são documentados, apesar de serem de grande importância, já que são essenciais para a construção de um programa de controle e profilaxia. Segundo Restrepo *et al*, (2008) esses fatos são justificáveis, frente a ausência de políticas e investimentos governamentais de suporte as pesquisas.

Um dos estudos realizados sobre a detecção do agente etiológico da paratuberculose nos rebanhos colombianos foi de Fernandez-Silva *et al*, 2005 onde 307 animais, provenientes de 14 rebanhos localizados na região andina da Colômbia, tiveram amostras de soro e fezes coletadas e submetidas a testes sorológicos (ELISA), molecular (PCR) e microbiológico (cultivo). Nessa pesquisa as amostras foram submetidas ao teste de ELISA-A, que baseia-se na detecção de lipoarabinomanano, e quando positivas a esse teste, foram submetidas aos demais testes. Das 307 amostras, 31 foram positivas ao ELISA-A, o que corresponde a 10% dos animais testados em 71% dos rebanhos. Dos 31 resultados positivos, apenas dois foram positivos ao ELISA-B, que se baseia na detecção de anticorpos anti-antígenos MAP, seis a PCR e nenhum ao cultivo. Os dois resultados positivos ao ELISA-B, são de animais de rebanhos diferentes, mas que pertencem ao mesmo proprietário, entre os quais é realizado transito de animais, reafirmando a natureza altamente contagiosa da doença.

Em Fernandez-Silva *et al* (2011), foram utilizados o teste de ELISA, cultivo microbiológico, PCR, além do teste de ISSR (Multilocus Short Sequence Repeat) para caracterização molecular das cepas de MAP. Nesse estudo,

assim como no anterior, a concordância entre os resultados encontrados aos diferentes testes foi considerada baixa.

Em um estudo em 2011 por Fernandez-Silva *et al*, analisaram 386 amostras de fezes, 329 amostras de soro dos mesmos animais, amostras ambientais, coletadas na sala de ordenha dos estabelecimentos, além de amostras de tecido de um animal com sintomatologia compatível com a doença de Johne, o qual foi eutanasiado. Os bovinos eram provenientes de cinco rebanhos, dos quais foram obtidos seis (1,8%) resultados positivos ao ELISA, em 40% dos rebanhos e oito resultados positivos ao cultivo, quatro de amostras de fezes, dois de tecido e dois das amostras ambientais. Todos os isolados obtidos ao cultivo e ao PCR real time foram compatíveis com MAP. Com relação à caracterização molecular dos isolados obtidos através do ISSR, verificou-se que as amostras fecais, uma das amostras ambientais e uma das amostras de tecido correspondiam a um tipo de cepa, enquanto a outra amostra de tecido e a amostra restante das ambientais correspondiam a outro, confirmando a presença, manutenção e circulação de mais de uma cepa do agente no rebanho.

Waard, 2010, realizou um estudo com 55 bovinos, provenientes do rebanho da Faculdade de Medicina Veterinária de Córdoba, em Monteria, onde os animais foram submetidos ao ELISA, e verificou que 25% dos animais eram positivos.

A prova de intradermoreação, foi usada nas análises de Ramirez *et al*, (2011), aliada a um estudo retrospectivo dos dados coletados entre 2000 e 2008 sobre o rebanho de 105 animais da Universidade de Atioquia em San Pedro de Los Milagros, onde havia cinco casos compatíveis com a doença. Os dados analisados incluíam, além da prova de intradermoreação, dados sobre a necropsia, análises histopatológicas e alterações clínicas. Os animais apresentavam diarreia crônica, enfraquecimento e melena, assim como achados necropsiais de emaciação, espessamento da mucosa, tumefação e congestão da mesma, assim como achados histopatológicos de enterite e linfadenite granulomatosa. Em três deles observou-se também, à histologia, a presença de grande quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR)

intracelulares em macrófagos, células gigantes, e no interstício. Através dessas análises os autores puderam confirmar a presença da paratuberculose no rebanho.

Em 2009, Jimenéz *et al*, publicaram um estudo analisando um rebanho de 250 ovinos, quanto a presença do agente etiológico da doença de Jonhe, através da Baciloscopia (Ziehl-Neelsen, ZN) de amostras de fezes, do teste de intradermorreação a tuberculina aviária e à análise sorológica do ELISA, obtendo resultados positivos em 4% das amostras à coloração de Ziehl-Neelsen, em 6,4% das amostras ao teste de intradermorreação e em 0,8% das amostras ao ELISA.

Na grande maioria dos estudos obteve-se uma baixa concordância entre os testes, e explicações para tal foram descritas em todos os artigos e incluem a sensibilidade, especificidade e ao alvo de detecção de cada teste, sejam os últimos: anticorpos, antígenos ou a presença do micro-organismo em sua forma viável ou não-viável.

Segundo esses estudos baciloscopia com a coloração de Ziehl-nielsen, é um teste que possui apenas 86% de especificidade e devido à distribuição desigual e a eventual baixa carga bacteriana encontrada nos animais infectados, podendo ocorrer a subdetecção de MAP nesse teste.

Com relação ao ELISA, os autores também descreveram a discordância entre os resultados de diferentes kits utilizados como resultado do alvo de detecção de cada um, que envolvem os diferentes tipos de resposta imune que estão influenciadas pela fase da infecção ou ainda, a detecção de antígenos bacterianos, por exemplo.

Os resultados obtidos a prova de intradermorreação com a tuberculina aviária também foram questionados nos estudos, relatando-se que pode haver reação cruzada quando animais foram previamente submetidos ao teste de intradermorreação com a tuberculina bovina, para o estabelecimento do status do rebanho acerca da infecção pelo *M. bovis*, resultando em amostras falso-positivas ao teste. Vale lembrar, que o resultado positivo ao teste da tuberculina aviária não indica especificamente resposta a infecção com MAP,

podendo ser na verdade a infecção por outra micobactéria do complexo *Mycobacterium avium*, ou uma das situações descritas acima.

Dessa forma os estudos descritos mostram a presença, manutenção e circulação de MAP nos rebanhos da Colômbia e manifestam a preocupação diante da ausência de programas e investimentos para o controle, prevenção e erradicação da doença.

México

O México, país localizado no sul da América do Norte, sob as coordenadas 23° 00' N, 102° 00' W, limita-se ao norte com os Estados Unidos, ao sul com Guatemala e Belize; ao leste com o Golfo do México e a oeste com o Oceano Pacífico e possui a segunda maior economia da América Latina.

A pecuária bovina, de grande importância para o país, é extensiva e concentra-se na região central do país.

Em 2012, Martínez-Herrera e colaboradores, realizaram um inquérito soropidemiológico em caprinos de cinco municípios do centro de Veracruz, através de ELISA indireto. A soroprevalência total de paratuberculose nos rebanhos foi de 0,6% (1/182), o que demonstra uma baixa distribuição de MAP nesta região do México. Méndez e colaboradores. (2008) realizaram uma análise descritiva dos casos de paratuberculose ovina e caprina recebidos para diagnóstico em um laboratório no México. Neste estudo, 18% das amostras recebidas (418) foram soropositivas. Morón-Cedillo *et al.* (2013) analisaram, através de nested-PCR e de imunodifusão em gel de ágar, a prevalência de infecção por MAP em ovinos, sendo testados 211 animais assintomáticos. Na IDGA, a prevalência encontrada foi 9,48%; e na nested-PCR, foi de 7,58%. Carrillo-Casas *et al.* (2010) detectaram MAP em amostras de leite de rebanhos bovinos e caprinos na região central do país. Foram analisados, através de ELISA indireto, isolamento e PCR, 759 bovinos e 371 caprinos. A soroprevalência variou entre 8 e 24% nos rebanhos bovinos e 8,29 e 9,67% nos caprinos; e o isolamento de colônias compatíveis com MAP foi verificado em 10 amostras de leite bovino de conjunto. O DNA de MAP foi detectado no

leite do tanque de todos os 14 rebanhos bovinos, mas não nas amostras individuais, o que informa que o tanque e as máquinas relacionadas à ordenha não podem ser descartadas como fontes de contaminação. A detecção de MAP encontrada neste estudo reitera o risco do consumo de leite cru para a saúde pública.

Venezuela

A Venezuela está localizada no norte da América do Sul, sob as coordenadas 8 00 N, 66 00 O e delimitada ao norte pelo mar do Caribe, ao sul pelo Brasil, a oeste pela Colômbia e a leste pela Guiana. O país tem uma área total de 916.445 quilômetros quadrados e uma área terrestre de 882.050 quilômetros quadrados.

A Venezuela detém a 5ª maior economia da América Latina, depois do Brasil, México, Argentina e Colômbia, voltada para a exportação, principalmente de petróleo, com destino aos Estados Unidos (33,6%) e depois ao Brasil (11,7%) (VENEZUELA 2014). Com relação a produtos de origem animal o país é principalmente importador, sendo a maior parte desses produtos proveniente do Brasil (APEX BRASIL 2011).

Os estudos da paratuberculose na Venezuela são escassos. Um estudo realizado no Estado de Zulia relata a presença de MAP em rebanhos de bovinos crioulos limonero. Neste, a avaliação sorológica e por PCR, permitiu assegurar a existência de animais infectados com taxas de positividade de 1,45% (3/207) e 5,19% (3/77) para amostras de sangue e leite, respectivamente (Sánchez-Villalobos *et al*, 2009). Além disso, um segundo estudo realizado na Venezuela com o objetivo de cultivar MAP de amostras de leite pasteurizado comercial revelou que nenhuma das 83 amostras eram positivas para o agente. Mas em duas amostras provenientes de propriedades distintas foi demonstrado o crescimento de seis colônias identificadas como *Mycobacterium bovis* (Méndez *et al*, 2006).

A principal importância da Venezuela no sentido do desconhecimento da paratuberculose se detém na importação de animais vivos e produtos de

origem animal sem uma avaliação do comprometimento desses produtos, colocando em risco o rebanho venezuelano. Além disso, a presença de animais positivos no país comprova a importância de medidas imediatas de controle da doença no rebanho nacional.

Peru

O Peru, país localizado na porção oeste da América do Sul, sob as coordenadas geográficas 10 00 S, 76 00 W limita-se ao sul com o Chile, a leste com o Brasil e Bolívia e ao norte com o Equador e Colômbia, pertencendo ao Hemisfério Meridional.

A economia nacional baseia-se no extrativismo mineral, porém a agropecuária também é responsável por empregar grande parte da população, gerando aproximadamente 11,5% do PIB do país segundo o Ministério da Agricultura Peruano. Apesar de autossuficiente na produção de carne, o Perú importa grande quantidade do produto principalmente da Argentina e do Brasil.

O rebanho bovino no país é de cinco milhões de animais, e a maior parte desses está concentrada em pequenas fazendas, tanto com relação a produção de carne quanto a de leite. Segundo o INEI-Instituto Nacional de Estatística e Informática (INEI 2012) o setor pecuário do Peru Cresceu 3,62%, entre janeiro de 2011 e janeiro de 2012, representando um aumento de 3,12% na produção de carne e de 4,54% na produção de leite.

No estudo de Ortiz *et al* (2009), é reportado o primeiro isolamento do agente no país, de um animal macho de 4 anos de idade, que não apresentava nenhuma sintomatologia clínica. Nesse relato, inicialmente realizou-se ELISA a partir do soro, obtendo resultado positivo. Em seguida procedeu-se a coleta de fezes, que foram submetidas ao cultivo, coloração de Ziehl Nielsen e PCR. onde também foram encontrados animais positivos para a presença de MAP.

Já no estudo de Bustamante *et al* (2011), foram testadas amostras de 60 vacas provenientes de 3 fazendas, na região de Lima, através de dois kits diferentes de ELISA, cultivo microbiológico e prova intradérmica de tuberculina. Os animais foram submetidos aos testes sorológicos obtendo-se 22 resultados

positivos. Amostras de fezes foram coletadas desses 22 animais, processadas e submetidas ao cultivo microbiológico obtendo cinco resultados positivos, confirmados pela PCR. Houve uma concordância significativa apenas entre os dois kits de ELISA. Segundo o autor essa diferença entre os métodos diagnósticos pode ser devido ao tipo de detecção feita por cada um (detecção de MAP, da resposta imune celular ou humoral). Para o teste de ELISA, por exemplo, em que se detecta a imunidade humoral estimulada pelo agente, os resultados somente serão positivos nos momentos finais da infecção e na fase clínica da mesma. Além disso, MAP é um agente fastidioso e de crescimento lento e as amostras necessitam passar por um processo de descontaminação antes do cultivo, o que dificulta o isolamento e detecção do mesmo. Dessa forma, sem descartar a extrema importância da evidência de MAP nos animais, para medidas de controle e prevenção da paratuberculose, atenção especial deve ser dada a técnica empregada.

Até 2008, o Peru era um país considerado livre da paratuberculose, tendo esse status revogado, quando a OIE declarou a detecção de MAP no país, sem declarar qual método diagnóstico foi usado (ORTIZ *et al*, 2009). Dessa forma estudos como esse contribuem para ressaltar atenção que deve ser concedida a investigação da presença de MAP nos rebanhos daquele país.

Bolívia

O país, situado sob as coordenadas geográficas 17° S 65° O, faz fronteira com o Brasil, Peru, Chile, Paraguai e Argentina e possui economia baseada na indústria petrolífera e na agropecuária, sendo que a última representa 15% do PIB e emprega próximo de 5% da população, participando da área de livre comércio do Mercosul.

Em 2004, Deem e colaboradores publicaram um inquérito epidemiológico sobre diversos agentes patogênicos em veados cinza (*Mazama gouazoubira*) da região de Gran Chaco, na Bolívia. Entre estes agentes, foi

pesquisada a presença de MAP mas entre os 15 animais testados através de imunodifusão em ágar-gel, nenhum foi positivo.

Apesar do resultado negativo encontrado, a doença está conhecidamente presente em países da fronteira, como descrito anteriormente, e isso, aliado a importância da atividade agropecuária para a economia boliviana, reforça a necessidade de maior investigação sobre a paratuberculose nos animais deste país.

Panamá

O Panamá (9 00 N, 80 00 O) por sua vez, tinha 1,72 milhões de cabeças de gado. Brasil e Panamá assinaram, em 2008, um protocolo sanitário para liberação das exportações de sêmen e embriões bovinos. A partir de 2011, os dois países começaram a estudar a possibilidade de ampliar o comércio bilateral nessa área, indicando a possibilidade da entrada de MAP no país.

Em parceria com pesquisadores da Colômbia e da Venezuela, Goodridge e colaboradores (2013) desenvolveram um estudo onde 49% das amostras de soro de bovinos da raça Gyr e Jersey foram positivos ao teste de ELISA, assim como 2% dos animais Mestizo. Diante disso, novos estudos devem ser conduzidos para determinação da ocorrência de MAP nos rebanhos.

Outros países

Para Cuba, Guatemala, Haiti, República Dominicana, República Das Honduras, Nicarágua, El Salvador, Costa Rica, Paraguai, Equador não foram encontradas pesquisas acerca de MAP. Esse fato é preocupante, já que muitos desses países têm agropecuária em crescimento ou tem a agropecuária como parte importante do seu PIB. Além disso, muitos desses países fazem fronteiras com outros em que o agente foi detectado, e isso aliado ao comercio intenso de animais e produtos sugere que os rebanhos desses países também estejam expostos ao agente.

CONCLUSÃO

- Os países que realizaram o maior número de pesquisas foram Brasil, Argentina e Chile.
- As técnicas utilizadas na maioria dos estudos foram o cultivo, o ELISA e a PCR. Estudos para a caracterização molecular das cepas encontradas não são costumeiramente realizados.

REFERÊNCIAS

Acypreste, C.S.; Juliano, R.S.; Riveira, F.E.B.; Silva, L.A.F.; Fioravanti, M.C.S.; Filho, F.C.D. Uso Da Técnica Do Elisa Indireto Na Detecção De Anticorpos Anti-*Mycobacterium Paratuberculosis* Em Vacas Em Lactação. *Ciência Animal Brasileira*, V.6, P. 41-45, 2005.

Ayele, W.Y; Machackova, M; Pavlik, I. The Transmission And Impact Of *Paratuberculosis* Infection In Domestic And Wild Ruminants. *Veterinary Medicine - Czech*, V.46, P.205-224, 2001.

Apex-Brasil. Agência Brasileira De Promoção De Exportações E Investimentos. Venezuela – Perfil E Oportunidades Comerciais, 1-126, 2011.

Berquó. L. S, Aluísio Barros, J D Lima, R.C E Bertoldi, A. D. Utilização De Antimicrobianos Em Uma População Urbana. *Ver. Saúde Pública*, 2004;38(2);239-46

Bull, T.J.; Mcminn, E.J.; Sidi-Boumedine, K.; Skull, A.; Durkin, D.; Neild, P.; Rhodes, G.; Pickup, R.; Hermon-Taylor, J. Detection And Verification Of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* In Fresh Ileocolonic Mucosal Biopsy Specimens From Individuals With And Without Crohn's Disease. *Journal Of Clinical Microbiology*, V.41, N.7, P.2915-2923, 2003.

Brandt, L. V., Coudijzer, K., Herman, L., Michiels, C., Hendrickx, M., & Vlaemynck, G. Survival Of *Mycobacterium avium* Ssp. *Paratuberculosis* In Yoghurt And In Commercial Fermented Milk Products Containing Probiotic Cultures. *Journal Of Applied Microbiology*, 110, 1252e1261. 2011

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.

Bustamante José; Aguilar, V; José Ortiz Martín M; *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* In Dairy Cattle In The Lima Area Detected Through Three Diagnostic Techniques. *Rev Inv Vet Perú* 2011; 22 (4): 394-402

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.

Crohn B.B, Ginzburg L, Oppenheimer J. Regional Ileitis. Journal Of The American Medical Association, V.99, P.1232-9, 1932

Carvalho, I.A.; Silva Jr, A.; Campos, V.E.B.; Moreira, M.A.S. Detection Of *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* By Polymerase Chain Reaction In Bovine Milk In Brazil. Journal Of Dairy Science, V.92, P.5408-5410, 2009.

Carvalho, I.A.; Silva, V.O.; Vidigal, P.M.P.; Silva Junior, A.; Moreira, M.A.S. Genetic Evaluation Of Is900 Partial Sequence Of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Brazilian Isolates From Bovine Milk. Tropical Animal Health And Production, 44 (7), 1331-1334, 2012.

Cirone, K, Morsella, C., Colombo, D., Paolicchi, F. Viabilidad De *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* En La Maduración De Quesos Caprinos Y Bovinos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 40(4):P. 507-513. 2006.

Cirone, K., Morsella, C., Romano, M., Paolicchi, F *Mycobacterium avium* Subsp *Paratuberculosis*: Presencia En Los Alimentos Y Su Relación Con La Enfermedad De Crohn. Revisión Bibliográfica. Revista Argentina De Microbiología, 39:P. 57-68. . 2007.

Collins, D. M. Update On *Paratuberculosis*: Epidemiology Of Johne's Disease And The Biology *Mycobacterium Paratuberculosis*. Irish Veterinary Journal, V. 56, N. 11, P. 565-574, 2003.

Clarke, C.J. The Pathology And Pathogenesis Of *Paratuberculosis* In Ruminants And Other Species. Journal Of Comparative Pathology, V.116. P.217-261, 1997.

Collins, M.T. Update On *Paratuberculosis*: Epidemiology Of Johne's Disease And The Biology Of *Mycobacterium Paratuberculosis*. Irish Veterinary Journal, V.56:1, P.565-574, 2003

Costa, J.C.M.; Pieri, F.A.; Souza, C.F.; Espescht, I.F.; Felipe, A.G.; Santos, G.M.; Tobias, F.L.; Silva Júnior, A.; Moreira, M.A.S. Levantamento Sorológico De *Mycobacterium avium* Subesp. *Paratuberculosis* Em Bovinos Leiteiros No Estado Do Espírito Santo. Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia, V.62 (6), P.1491-1494, 2010.

Dacorso Filho, P.; Campos, I.O.N.; Faria, J.F.; Langenegger, J. Doença De Johnne (Paratuberculose) Em Bovinos Nacionais. Arquivos Do Instituto Biológico Animal, V. 3, P. 129-139, 1960.

Dalto, A.C., Bandarra, P.M., Pavarini, S.P., Boabaid, F.M., Bitencourt, A.P.G., Gomes, M.P., Chies, J., Driemeier, D., Cruz, C.E.F. Clinical And Pathological Insights Into Johnne'S Disease In Buffaloes. Trop Anim Health Prod., 44:1899–1904, 2012.

De Lira, M.A.A., Simões S.V.D., Riet-Correa, F., Pessoa C.M.R., Dantas, A.F.M., Miranda Neto, E.G. Doenças Do Sistema Digestório De Caprinos E Ovinos No Semiárido Do Brasil. Pesq. Vet. Bras. 33(2):P.193-198, 2013.

Deem, S. L.; Noss, A. J. Villarroel. R; Uhart M.M, And Karesh W.B Disease Survey Of Free-Ranging Grey Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*) In The Gran Chaco, Bolivia. Journal Of Wildlife Diseases 40(1) P.92-98. 2004

Devinder K.; Stefan B.; Premkumar D.; Brigitte G.; Delphi C.; Michael R. M.; Varalakshmi D. V.; Dean C. C.; Mary J.; Patrick J. B., Biosynthesis Of Mycobacterial Lipoarabinomannan: Role Of A Branching Mannosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), P. 13664-13669. 2006

Driemeier, D., Cruz, C.E.F., Gomes, M.J.P., Corbellini, L.G., Loretti, A.P., Colodel, E.M. Aspectos Clínicos E Patológicos Da Paratuberculose Em Bovinos No Rio Grande Do Sul. Pesq. Vet. Bras. 19(3/4):109-115,1999.

Dupont, O. Jornal Do Commercio, V.5 De Novembro, P.8. 1915

Espinal. C.F.; Héctor J. Covaleda, M. Gaitán, X. A .La Cadena De La Carne Bovina En Colombia: Una Mirada Global De Su Estructura Y Dinamica . [Http://www.agrocadenas.gov.co](http://www.agrocadenas.gov.co) Bogotá, Marzo De 2005

Fernández, B., Gilardoni, L. R., Jolly, A., Colavecchia, S. B., Paolicchi, F. A., & Mundo, S. L. (Detection Of Bovine Igg Isotypes In A Ppa-Elisa For Johnne's Disease Diagnosis In Infected Herds. *Veterinary Medicine International*, 2012.

Fiorentino. M.A. A, A. Gioffréb, K. Cironea, C. Morsellaa, B. Alonsoc, F. Delgado, F. Paolicchi. First Isolation Of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* In A Dairy Goat In Argentina: Pathology And Molecular Characterization. *Small Ruminant Research* 108 (2012) P.133– 136 2012

Fernandez-Silva J. A., Abdulmawjood A., . Bulte M. Diagnosis And Molecular Characterization Of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis*

From Dairy Cows In Colombia Veterinary Medicine International Volume 2011, Article Id 352561, 12 Pgs, 2011

Fernandez-Silva J. A., Abdulmawjood A., Bulte M. Serological And Molecular Detection Of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* In Cattle Of Dairy Herds In Colombia. Trop Anim Health Prod (2011) 43:P 1501–1507. 2011

Ferreira, F., Fonseca, L.S., Lilenbaum, W. Agar Gel Immunodiffusion Test (Agid) Evaluation For Detection Of Bovine *Paratuberculosis* In Rio De Janeiro, Brazil. Letters In Applied Microbiology,, 35, P.173–175, 2002a.

Ferreira, R., Fonseca, L., Lilenbaum, W. Comparison Between A Commercial And An In-House Elisa Or Anti-M. Avium *Paratuberculosis* Antibodies Detection In Dairy Herds In Rio De Janeiro, Brazil. Rev Latinoam Microbiol. 44(3-4):P129-132, 2002b

Fonseca L.F., Santos M.V., Pereira C.C., Olival A.A., Hienemenn M.B., Richtzenhain L.J. Identificação Da Presença De Anticorpos Contra *Mycobacterium Paratuberculosis* Em Rebanhos Leiteiros Do Estado De São Paulo. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 66(Supl.):122. 1999.

Gilardoni, L. R., Paolicchi, F. A., & Mundo, S. L. Bovine *Paratuberculosis*: A Review Of The Advantages And Disadvantages Of Different Diagnostic Tests. Rev Argent Microbiol, 44, P-201-15. 2012.

Grinbergs, J.; Caorsi, I. Enfermedad De Johne O *Paratuberculosis* En Chile. Publ. Cient. Universidad Austral De Chile, V.4, P.9-13, 1958

Gioffre, A., Echeverria-Valencia, G., Arese, A., Morsella, C., Garbaccio, S., Delgado, F., Zumarraga, M., Paolicchi, F., Cataldi, A., Romano, M. Characterization Of The Apa Antigen From *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis*: A Conserved Mycobacterium Antigen That Elicits A Strong Humoral Response In Cattle. Veterinary Immunology And Immunopathology. 132(2-4) P.199-208. 2009.

González, Dirección De Análisis Económico Pecuário J Vet Diagn Invest 2006 18: 476 Disponível Em: [Http://www.Nuso.Org/Upload/Articulos/3535_1.Pdf](http://www.Nuso.Org/Upload/Articulos/3535_1.Pdf)

Goodridge,; Amador Correaa,Ricardo; Castro, Paul; Escobar, Cecilia;Waardd, Jacobus H. Serum Samples Can Be Substituted By Plasma Samples For The Diagnosis Of *Paratuberculosis* Preventive Veterinary Medicine 112 (2013) 147– 149

Grant, I.R; Ball, H.J; Rowe, M.T. Incidence Of *Mycobacterium Paratuberculosis* In Bulk Raw And Commercially Pasteurized Cows' Milk From

Approved Dairy Processing Establishments In The United Kingdom. Applied And Environmental Microbiology, V.68(5), P.2428-35, 2002

Hirst, H. L., Garry, F. B., Morley, P. S., Salman, M. D., Dinsmore, R. P., Wagner, B. A., ... & Goodell, G. M. Seroprevalence Of *Mycobacterium avium* Subsp *Paratuberculosis* Infection Among Dairy Cows In Colorado And Herd-Level Risk Factors For Seropositivity. Journal Of The American Veterinary Medical Association, 225(1), P.97-101. 2004.

IBGE. Produção Da Pecuária Municipal. Rio De Janeiro, V.39, P.1-63, 2011.

Inta – Instituto Nacional De Tecnologia Agropecuária 2012

Ipcva – Instituto De Promoción De La Carne Vacuna, 2012;

Inei- Instituto Nacional De Estadística E Informática Informe Técnico De Marzo De 2012- Por Dr. Alejandro Vilchez De Los Ríos (Disponible Em: [Http://Www.Inei.Gob.Pe/Web/Boletin/Attach/13779.Pdf](http://www.inei.gob.pe/web/boletin/attach/13779.pdf))

Ilsi - International Life Sciences Institute. *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* (Map) And The Food Chain. 2004, 35p.

Johnson, Y.J.; Kaneene, J.B.; Gardiner, J.C.; Lloyd, J.W.; Sprecher, D.J.; Coe, P.H. The Effect Of Subclinical *Mycobacterium Paratuberculosis* Infection On Milk Production In Michigan Dairy Cows. Journal Of Dairy Science, V.84, N.10, P.2188-2194, 2001.

Jorge, M. C., Traversa, M. J., Schettino, D. M., Giordano, A., Etchechoury, I., Sanz, H., ... & Romano, M. I. Lama Glama Con Signología Y Lesiones Compatibles Con *Paratuberculosis* Causadas Por *Mycobacterium avium* Subespecie Avium. *Invet*, 10(1), P.59-64. 2008

Kruze, J., Monti, G., Schulze, F., Mella, A., & Leiva, S. Herd-level prevalence of Map infection in dairy herds of southern Chile determined by culture of environmental fecal samples and bulk-tank milk qPCR. *Preventive veterinary medicine*, 111(3), P. 319-324.. 2013

Kruze J, Salgado M, Collinm T. *Paratuberculosis* En Rebaños Caprinos Chilenos *Paratuberculosis* In Chilean Dairy Goat Herds *Arch. Med. Vet.* 39, N° 2, P.147-152 2007

Kruze, J., Salgado, M., Paredes, E., Mella, A., & Collins, M. T. Goat *Paratuberculosis* In Chile: First Isolation And Confirmation Of *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* Infection In A Dairy Goat. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(5), P.476-479. 2006

Lamont, E.A., Bannantine, J.P., Armién, A., Ariyakumar, D.S. And Sreevatsan, S. Identification And Characterization Of A Spore-Like Morphotype In Chronically Starved *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Cultures. Plos One, 7 (1):E30648. (2012) Doi: 10.1371/Journal.Pone.0030648

Lilenbaum W., Marassi C.D., Oelemann W.M.R. *Paratuberculosis: An Update.* Brazilian Journal Of Microbiology, 38:580-590, 2007

Losinger, W.C. Economic Impact Of Reduced Milk Production Associated With Johne's Disease On Dairy Operations In The Usa. Journal Of Dairy Research, V.72, P.425-432, 2005

MADR- Ministerio Da Agricultura E Desenvolvimento Rural- Dirección De Política Sectorial — Grupo Noviembre De 2012 Análisis Sectorial

Marassi, C.D., Fonseca, L.S., Ristow, P., Ferreira, R., Lilenbaum, W., Oelemann, W.M.R. Improvement Of An In-House Elisa For Bovine *Paratuberculosis* Serology In Brazil. Brazilian Journal Of Microbiology, 36:118-122, 2005.

Marassi, C.D., Mcnair, J., Pollock, J., Ristow, P., Fonseca, L.S., Oelemann, W.M.R., Lilenbaum, W. The Use Of Mpb70 And Mpb83 To Distinguish Between Bovine Tuberculosis And *Paratuberculosis*. Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases, 33, 485–489, 2010.

Medeiros, J.M.A., Garino Junior, F., Almeida, A.P., Lucena, E.A., Riet-Correa, F. Paratuberculose Em Caprinos E Ovinos No Estado Da Paraíba. Pesq. Vet. Bras. 32; 2; P.111-115,2012A

Medeiros, J.M.A., Garino Junior, F., Matos, R.A.T., Costa, V.M.M., Riet-Correa, F. Frequência De Anticorpos Para Paratuberculose Em Bovinos No Semiarido Paraibano. Pesq. Vet. Bras. 32(8):697-700, 2012b.

Méndez, D., Giménez, F., Escalona, A., Mata, O., González, A., Takiff, H., Waard, J.H. Mycobacterium Bovis Cultured From Commercially Pasteurized Cows' Milk: Laboratory Cross-Contamination. Veterinary Microbiology, 116, P.325–328, 2006.

Ministerio De Agricultura Y Desarrollo Rural- Observatorio Agrocadenas Colombia. Documento De Trabajo No. 73
[Http://Www.Agronet.Gov.Co/Www/Docs_Agronet/2005112144930_Caracterizacion_Bovina.Pdf](http://www.Agronet.Gov.Co/Www/Docs_Agronet/2005112144930_Caracterizacion_Bovina.Pdf)

Moreira, A., And J. Tosi,: *Paratuberculosis* Bovina: Importancia De La Enfermedad En La Region, Informe Tecniconro Cerbas Inta Press, Argentina. P.1-14, 1995

Moreira, A., E. Spath, And C. Morsella, Seroprevalence Of Johne's Disease In Eleven Districts Of Buenos Aires, Argentina. In: Chiodini, R., M. Collins, And E. Basse, (Eds), Proceedings Of The Fourth International Colloquium On *Paratuberculosis*, St John's College Cambridge, Uk. July 17–21, P. 33, 1994:

Moreira, A., Paolicchi, F., Morsella, C., Zumarraga, M., Cataldi, A., Bigi, F., Alito, A., Overduin, P., Van Soolingen, D., Romano, M. Distribution Of Is900 Restriction Fragment Length Polymorphism Types Among Animal *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Isolates From Argentina And Europe". *Veterinary Microbiology*, 70: P.251-259. 1999

Marco, I., Ruiz, M., Juste, R., Garrido, J.M., Lavin, S., *Paratuberculosis* In Free-Ranging Fallow Deer In Spain. *J. Wildl. Dis.* 38, P-629–632. 2002

Martínez Herrera, D. I., Sarabia-Bueno, C. D. C., Peniche-Cardena, A. E. D. J., Villagómez-Cortés, J. A., Magdaleno-Méndez, A., Hernández-Ruiz, S. G. & Flores-Castro, R. Seroepidemiology Of Goat *Paratuberculosis* In Five Municipalities Of Central Veracruz, Mexico. *Tropical And Subtropical Agroecosystems*, 15(S2) 2012.

Mota, P. M.P.C. , Pires, P. S., Assis, R.A., Salvarani, F. M., Leite, R. M.H., Dias, L.D., Leite, R.C., *J Vet Diagn Invest* 18: P-476 2006;

Nielsen, S. S., & Toft, N. A Review Of Prevalences Of *Paratuberculosis* In Farmed Animals In Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 88(1), P.1-14. 2009

Oliveira, D. M., Riet-Correa, F., Galiza, G. J., Assis, A. C., Dantas, A. F., Bandarra, P. M., & Garino Jr, F. Paratuberculose Em Caprinos E Ovinos No Brasil. *Pesq. Vet. Bras*, 30:1, P. 67-72. 2010

Ormaechea, J.I.; Gisbert, J.P.; Marín-Jiménez, I. Papel De *Mycobacterium avium Paratuberculosis* Em La Etiopatogenia De La Enfermedad De Crohn. *Gastroenterología Y Hepatología*, V.32, P.353-363, 2009.

Ortiz Mm, Acosta Am, Acosta Gr, Zumarraga Mj – Primer Informe De Aislamiento De *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* En El Perú Senasa 2009 (Disponível Em [Http://Www.Senasa.Gob.Pe/Repositorioaps/0/4/Jer/Infointer/Primer%20aislamiento%20map%20en%20peru%20revisado.Pdf](http://www.Senasa.Gob.Pe/Repositorioaps/0/4/Jer/Infointer/Primer%20aislamiento%20map%20en%20peru%20revisado.Pdf))

Ott, S.L.; Wellsb, S.J.; Wagnera, B.A.; Herd-Level Economic Losses Associated With Johne's Disease On Us Dairy Operations. *Preventive Veterinary Medicine*, V.40 P.179-192, 1999.

OIE- Organização Mundial De Saúde Animal. Disponívem Em : [Http://
Www.Oie.Int](http://www.oie.int)

Paolicchi F.; Cirone K.; Morsella, C.; Gioffré, A. First Isolation Of *Mycobacterium avium* Subsp *Paratuberculosis* From Commercial Pasteurized Milk In Argentina. Brazilian Journal Of Microbiology P 1034-1037 2012.

Paolicchi, F., Vagnozzi, A., Morsella, C., Verna, A., Massonne, A., Portiansky, E., Gimeno, E. "Paratuberculosis In Red Deer (*Cervus Elaphus*): An Immunohistochemical Study". Journal Of Veterinary Medicine "B", 48 P.313-320. 2001

Paolicchi, F.; Zumárraga, M.; Gioffre, A.; Zamorano, P.; Morsella, C.; Verna, A.; Cataldi, A.; Alito, A.; Romano, M. Application Of Different Methods For The Diagnosis Of *Paratuberculosis* In Dairy Cattle Herds In Argentina. J. Vet. Med. 50, P.20-26. 2003

Paolicchi, F., Vagnozzi, A., Morsella, C., Verna, A., Massonne, A., Portiansky, E., Gimeno, E. *Paratuberculosis* In Red Deer (*Cervus Elaphus*): An Immunohistochemical Study. Journal Of Veterinary Medicine "B", 48 16 P. 313-320. 2001

Pradenas M, Navarrete-Tallonia Mj, Salgado M Zamoranob, , P Paredes, E. *Paratuberculosis* Or Avian Tuberculosis In Red Deer With Chronic Diarrhea? Arch Med Vet 46, 45-52 (2014)

Ramírez, N., Rodríguez, B., & Fernández, J. Clinical and histopathological diagnosis of bovine *paratuberculosis* in a dairy herd in Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 16(3), P. 2742-2753. 2011

Ramos, E. T., F. P. Poester, Paratuberculose Em Bovinos No Estado Do Rio Grande Do Sul. A Hora Veterinária, V.34, N.6, P.28-32. 1986

Restrepo Z., Rodas G., Maldonado E. *Paratuberculosis* Bovina: ¿Conocemos La Situación Real De La Enfermedad En La Ganadería Colombiana? Rev Colomb Cienc Pecu; 21 P.420-435 2008.

Ristow, P., Marassi, C.D., Rodrigues, A.B.F., Oelemann, W.M., Rocha, F., Santos, A.S.O., Carvalho, E.C.Q., Carvalho, C., Ferreira, R., Fonseca, L.S., Lilenbaum, W. Diagnosis Of *Paratuberculosis* In A Dairy Herd Native To Brazil. The Veterinary Journal, V.174, N.2, Sep, P.432-434. 2007.

- Ristow, P., Silva, M.G., Fonseca, L.S., Lilenbaum, W.** Evaluation Of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Faecal Culture Protocols And Media. *Pesq. Vet. Bras.* 26(1) P.:1-4, 2006.
- Rivera F.E.B.** Levantamento Sorológico Utilizando-Se A Técnica De Elisa Em Rebanhos Apresentando Problemas Reprodutivos. I. Enterite Paratuberculose. *Anais I Encontro De Laboratórios De Diagnóstico Veterinários Do Cone Do Sul*, P.20-22. 1996.
- Rodrigues, A.B.F., Ristow, P.C.L.V.B., Santos, A.S.O., Lilenbaum, W., Carvalho, C.P., Carvalho, E.C.Q.** Anatomopathology Of *Paratuberculosis* In Dairy Cattle From Resende – Rj. *Ci. Anim. Bras.*, 13 (2), P. 228-233, 2012.
- Romano, M.I., Amadio, A., Bigi, F., Klepp, L., Etchechoury, I., Noto Llana, M., Morsella, C., Paolicchi, F., Pavlik, I., Bartos, M. Leão, S.C., Cataldi, A.** Further Analysis Of Vntr And Miru In The Genome Of *Mycobacterium avium* Complex, And Application To Molecular Epidemiology Of Isolates From South America. *Veterinary Microbiology* 110, P.221–237, 2005
- Ryan K. J.; Ray C. G.**, Sherris Medical Microbiology, Mcgraw Hill. 4ª Edição. 2004.
- Sá, L.M., Oliveira, J.M.B., Santos, G.R., Brandespim, D.F., Silva Júnior, J.L., Mota, R.A., Pinheiro Júnior, J.W.** Avaliação Sorológica E De Fatores De Risco Para A Infecção Por *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Em Rebanhos Leiteiros Da Microrregião De Garanhuns, Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 33(3):P.310-313, 2013.
- Salgado, M.; Steuer, . Troncoso, P; E; Collins, M.T.** Evaluation Of Pms–Pcr Technology For Detection Of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Directly Fromty Bovine Fecal Specimens *Veterinary Microbiology* 167P.725–728. 2013
- Salgado, M.; Manning, E. J. B.; Monti G.; Go" Ran Bo" L., Ruiz, R.S.; Paredes, E. ; Leiva S.; Van Kruningen H., And Kruze J .** European Hares In Chile: A Different Lagomorph Reservoir For *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis*? *Journal Of Wildlife Diseases*, 47(3), , P. 734–738. 2011
- Salgado, M.; Kruze. J.; Collins, M. T.** Diagnosis Of *Paratuberculosis* By Fecal Culture And Elisa On Milk And Serum Samples In Two Types Of Chilean Dairy Goat Herds. *J Vet Diagn Invest* 19: 99. 2007
- Sánchez-Villalobos, A., Arráiz-Rodríguez, N., Becerra-Ramírez, L., Faria, N., Montero-Urdaneta, M., Oviedo-Bustos, A., & Pino-Ramírez, D.** Infección

por *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* en un rebaño criollo limonero. *Revista Científica*, 19(6), P. 555-565.2009

Schaik, G. Van. , Haro, F Mella. A.; Kruze, J. Bayesian Analysis To Validate A Commercial Elisa To Detect *Paratuberculosis* In Dairy Herds Of Southern Chile. *Preventive Veterinary Medicine* 79 59–69 A 2007

Schaik, G. V.; Pradenas M.;F.; Mella A.N. N. Kruze, Juan V. Diagnostic Validity And Costs Of Pooled Fecal Samples And Individual Blood Or Fecal Samples To Determine The Cow- And Herd-Status For *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* *Preventive Veterinary Medicine* 82 159–165 B 2007

Senasa - Informe Mensual De Exportaciones Complejo Bovino 2010

Senasa – Servicio Nacional De Sanidad Y Calidad Agroalimentaria, 2010;

Soto J. P.; . Kruze M.V.; J,;. Leiva S., B. Comparison Of Three Different Methods For The Diagnosis Of Bovine *Paratuberculosis* In Infected Dairy Herds *Arch. Med. Vet.* Xxxiv, N° 2, 2002

Schwarz, D.G.G., Carvalho, I.A., Pietralonga, P.A.G., Faria, A.C.S., Moreira, M.A.S. Paratuberculose Em Pequenos Ruminantes Domésticos. *Arq. Inst. Biol.*, 79, 3,P.443-452, 2012.

Souza,G.S., Rodrigues, A.B.F., Gioffré, A., Romano,M.I., Carvalho, E.C.Q., Ventura, T.L.B., Lasunskia, E.B. Apa Antigen Of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* As A Target For Species-Specific Immunodetection Of The Bacteria In Infected Tissues Of Cattle With *Paratuberculosis*. *Veterinary Immunology And Immunopathology*, 143, P. 75– 82, 2011.

Thorel, M.F; Krichevsky, M; Levy-Frebault, 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.

Ubach, F.A., Observaciones Sobre La Enfermedad De Johne Y La Enteritis Coccidiósica De Los Bovinos, Ovinos Y Caprinos Identificadas En La República Argentina. *Rvta. Med. Vet. Bs. As.* 23, P.3–45. 1941

Varges, R., Marassi, C.D., Oelemann, W., Lilenbaum, W. Interference Of Intradermal Tuberculin Tests On The Serodiagnosis Of *Paratuberculosis* In Cattle. *Research In Veterinary Science*, 86 P,371–372, 2009.

Venezuela (2014) Instituto Nacional De Estadística
[Http://Www.ine.Gov.Ve/Documentos/Economia/Comercioexteriorcomentarios/H
tml/Cuadrocomercioexport.Php?Cuadro=3&Tipo=E](http://www.ine.gov.ve/documentos/economia/comercioexterior/comentarios/html/cuadrocomercioexport.php?cuadro=3&tipo=E)

Waard J. H. Milking Mycobacteria From Cattle? Health And Economic Impact Of Bovine Tuberculosis And *Paratuberculosis* In Colombia. *Rev.Mvz Córdoba* 15(2) P.2037-2040, 2010.

Wagner, J.; Sim, W.; Bishop, R.F.; Catto-Smith, A.G.; Cameron, D.J.; Kirkwood, C.D. *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* In Children With Early-Onset Crohn's Disease: A Longitudinal Follow-Up Study. *Inflammatory Bowel Disease*, V.17, P.1825-1826, 2011.

Wu, C.; Livesey, M.K.; Schmoller, S.; Manning, E.J.B.; Steinberg, H.; Davis, W.C.; Hamilton, M.J.; Talaat, A.M. Invasion And Persistence Of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* During Early Stages Of Johne's Disease In Calves. *Infection And Immunity*, V.75, N.5, P.2110-2119, 2007.

Yamasaki, E.M., Brito, M.F., Mota,R.A., Mcintosh, D.,Tokarnia, C.H. Paratuberculose Em Ruminantes No Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(2) P.127-140, 2013.

Zare, Y. . Evidence Of Birth Seasonality And Clustering Of *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* Infection In Us Dairy Herds. *Preventive Veterinary Medicine*, V. 112, N. 3, P. 276-284, 2013.

Zamora, J.; Kruze, J.; Schifferli, C. Ovine Paratuberculosis: First Case Reported In Chile. *Arch Med Vet*, V. 7, P. 15-17, 1975

CAPÍTULO 2- *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* em água para consumo humano e animal da Zona da Mata mineira e caracterização dos fatores socioeconômicos e sanitários das propriedades

Espechit, I.F.; Souza, M. C. C.; Lima, M. C.; Valêncio A.; Moreira, M. A. S.

RESUMO

Paratuberculose ou doença de Johne, doença inflamatória infectocontagiosa intestinal crônica, pode afetar os ruminantes domésticos e selvagens. Causada pelo bacilo Gram positivo *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP), os animais geralmente se infectam no início da vida, pela ingestão de água, colostro e alimentos contaminados. Entre os caprinos, os sinais da doença são perda de peso progressiva e a diarreia, que pode estar presente ou não. Os animais eliminam o agente principalmente pelas fezes e leite contaminando o solo e a água, que por sua vez mantém o ciclo de infecção de animais e expõe populações humanas ao agente. O objetivo do estudo foi detectar MAP em amostras de água para consumo humano e animal, coletadas em 10 propriedades de caprinocultura leiteira, da Zona da Mata mineira e realizar a caracterização das mesmas. Para a detecção do agente foram utilizadas as técnicas de cultivo microbiológico e de PCR. Para a caracterização das propriedades foi aplicado um questionário sobre variáveis da propriedade, incluindo aspectos sanitários, nutricionais, reprodutivos, entre outros. O agente foi identificado viável em água para consumo animal, de quatro propriedades, também positivas à PCR. Dentre essas, duas também foram positivas a PCR das amostras de água para consumo humano. Além dessas amostras, DNA do agente foi detectado na água de uma quinta propriedade nas amostras de água para consumo animal e humano. Portanto, o agente foi identificado em 50% das amostras de água para consumo animal e em 30% das amostras de água para consumo humano. A caracterização das propriedades sugere possíveis fatores de risco, como a utilização de fonte de abastecimento de água não tratadas, como poço ou nascente. Esses resultados reforçam o envolvimento da água como via de transmissão de MAP, contribuindo para manutenção do agente no rebanho, além de também ser fonte de contaminação do solo e da água para consumo. O possível envolvimento de MAP na DC, associado às perdas econômicas e produtivas, evidenciam a importância da pesquisa sobre o agente na água. Esse é o primeiro relato de isolamento de MAP de amostras de água para consumo animal em propriedades de caprinos leiteiros e da

identificação do agente em água para consumo humano nesse tipo de instalação.

Palavras Chave: Johne, zoonótico, bebedouro, PCR, MAP

Introdução

A paratuberculose ou doença de Johne é uma doença infecciosa crônica, caracterizada por diarreia persistente e perda de peso progressiva, cujo agente etiológico é a bactéria *Mycobacterium avium* ssp.. *paratuberculosis* e que acomete principalmente ruminantes. O micro-organismo é transmitido pela rota fecal-oral, sendo os animais geralmente infectados no início da vida, ao ingerirem o bacilo (Chiodini *et al.*, 1984; Sweeney, 1996). Em caprinos e ovinos geralmente os sinais aparecem quando o animal possui cerca de um ano de idade e se resumem principalmente a perda de peso progressiva, podendo a diarreia estar presente ou não.

A caprinocultura no Brasil demonstra tendência de crescimento e evolução da atividade, se consolidando como importante alternativa pecuária, principalmente para as regiões áridas, devido à capacidade destes animais de adaptação e resistência às condições climática. Verifica-se aumento significativo nas explorações para produção de leite, assim como para produção de carne e leite, constituindo fonte de renda para populações com elevado risco de exclusão social. (Farias *et al* 2014).

O efetivo de caprinos do Brasil, passou de seis milhões e quinhentos mil animais em 1996 para aproximadamente 10 milhões e quatrocentas mil cabeças em 2006. A exploração 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 seus mestiços (Borges, 2003).

As principais vias de eliminação do agente por animais doentes são através das fezes e do leite que contaminam os pastos, local e utensílios de ordenha e que direta ou indiretamente, contaminam os cursos d'água podendo dessa forma infectar humanos. Para o diagnóstico dos animais com

paratuberculose é utilizado o cultivo microbiológico de amostras de fezes. Apesar de ser considerado o padrão-ouro, o cultivo coprológico está condicionado à eliminação do agente nas fezes, o que ocorre de forma intermitente, aumentando o risco de um resultado falso-negativo. Além disso, o cultivo coprológico é difícil, devido ao alto grau de contaminação desse tipo de amostra, que dificulta o isolamento do agente. MAP demonstrou sobreviver em situações de estresse por longos períodos, fazendo da água uma amostra adequada para o diagnóstico, já que não estaria condicionada a eliminação intermitente da bactéria e nem à fase ativa da resposta imune ao agente. (Mishina et., al 1996; Pierce, 2009; Beumer et., al 2010).

Já foi demonstrada a resistência de MAP a pasteurização e a processos de desinfecção aplicados ao tratamento da água para consumo humano. Foi demonstrado que o agente pode ser capaz de formar estruturas semelhantes a esporos, o que contribui para maior resistência no ambiente, dificultando a sua recuperação em cultivo microbiológico. (Whan et., al 2001; Pierce, 2009; Beumer et., al 2010; Lamont *et al*, 2012).

Trabalhos realizados nos EUA e Europa identificaram MAP em amostras de água, porém ainda não há consenso de qual a metodologia adequada da pesquisa de agente nesse tipo de amostra. Mas há o consenso de que a técnica molecular é uma das ferramentas mais adequadas para esse propósito. (Mishina et., al 1996; Pickup et., al 2005; Beumer et., al 2010)

Indícios do papel da água como via de transmissão da bactéria à humanos e seu envolvimento no aparecimento de doenças intestinais como a DC foram demonstrados por Pierce (2009), que apresentou o que denomina de “Cluster” de casos da doença. Nesse estudo, indivíduos que moravam em uma determinada região foram diagnosticadas com DC somente após mudarem-se para o mesmo bairro. Esses indivíduos não possuíam relação alguma, além de suas moradias próximas e a utilização da mesma fonte de abastecimento de água para consumo, sugerindo que o desencadeamento do quadro tenha se dado a partir da ingestão de água contaminada com MAP.

Diante disso a ocorrência da bactéria na água para consumo e até mesmo na água bruta ainda não está clara, permanecendo aberta a questão

sobre a sua presença nesse tipo de amostra e o papel da mesma no ciclo de infecção do agente.

1-Objetivo

Verificar a ocorrência de MAP em água para consumo humano e animal e realizar a caracterização socioeconômica e sanitária de fazendas de caprinos leiteiros da Zona da Mata Mineira.

2- Materiais e métodos

Esse estudo foi realizado nos laboratórios de Doenças Bacterianas (LDBAC); e de Biologia Molecular (BIOMOL) do Departamento de Veterinária; e no Laboratório de Controle da Qualidade da Água, da Divisão de Água e Esgoto (LCQA). Todos pertencem a Universidade Federal de Viçosa;

2.1 Seleção das propriedades

Foi realizada a amostragem planejada a partir de uma listagem de 41 propriedades de caprinos leiteiros da mesorregião da Zona da Mata do estado de Minas Gerais, obtida através da Associação de Produtores de Leite de Cabra da Zona da Mata mineira (CAPRIMA). Foram selecionadas dez (24,39%) propriedades, de acordo com a distribuição nas diferentes microrregiões. As microrregiões estão descritas na figura 1, e a distribuição das propriedades produtoras de leite de cabra nas microrregiões da Zona da Mata Mineira e podem ser verificados na tabela 1.

O contato inicial com os produtores foi realizado por telefone, quando 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, aleatoriamente, Foram incluídas apenas fazendas com um número mínimo de 50 animais, afim de apenas incluir estabelecimentos com finalidade comercial. A amostragem das fazendas foi calculada utilizando-se o programa OpenEpi[®] (disponível em <http://www.openepi.com>), considerando-se prevalência estimada de 5%,

precisão 4% e intervalo de confiança 95%.O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (Anexo III)



Figura 1-Mapa da macrorregião da Zona da Mata mineira, os pontos representam as propriedades

Tabela 1-Distribuição das propriedades produtoras de leite de cabra nas microrregiões da Zona da Mata Mineira. *Na microrregião de Ponte Nova não foram amostradas propriedades, visto que há apenas uma.

Microrregiões	Quantidade	Porcentagem	Fazendas amostradas
Cataguases	6	14,63%	1
Juiz de Fora	13	31,71%	3
Manhuaçu	8	19,51%	2
Muriaé	9	21,95%	2
Ponte Nova*	1	2,40%	-
Ubá	2	4,88%	1
Viçosa	2	4,88%	1
TOTAL	41	100%	10

2.2- Amostras de água

Foram coletadas 20 amostras de 20 litros de água cada. Em cada propriedade foram coletados 2 amostras, sendo 1 amostra de água para consumo animal e 1 amostra de água para consumo humano. As amostras de consumo animal foram provenientes diretamente dos bebedouros dos animais e a água de consumo humano foi proveniente da torneira da fazenda, podendo ser do sistema público de abastecimento de água do município ao qual pertencia a propriedade ou proveniente de fonte alternativa de abastecimento (poço raso, poço artesiano/semi-artesiano, nascente). A água de consumo animal e humano foi proveniente da mesma fonte de abastecimento em cada uma das localidades.

Os frascos de coleta foram previamente desinfetados com hipoclorito de sódio 2,5% ficando em contato por um período mínimo de 24 horas, seguido da lavagem com água corrente e por último, lavados com água destilada autoclavada.

2.3 -Processamento das amostras

O processamento das amostras foi realizado segundo Pickup *et al*, (2005), com modificações, como descrito a seguir.

A amostra de água foram filtradas usando membranas filtrantes de éster de celulose (Merck Milipore, São Paulo, Brasil) de 0.22 µm de porosidade quantas necessárias para a filtração dos 20 litros, conforme as características da água. Após a filtração, as membranas foram depositadas em tubos de 50 ml, adicionadas de 30 ml PBS 0,5x pH 6,9, agitadas em vortex e raspadas com alças plásticas estéreis para desprendimento do material retido, até que as membranas estivessem completamente limpas. As membranas foram descartadas e o conteúdo recuperado foi alíquotado em microtubos de 1,5ml para realização de extração de DNA e cultivo microbiológico.

2.4-Cultivo microbiológico

O Cultivo microbiológico também foi realizado segundo Pickup *et al* (2005) com modificações. As amostras, os controles positivo (MAP K10) e

negativo (água ultra pura) foram centrifugadas a $3000 \times g$ por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. A etapa de descontaminação constituiu da adição de 15ml de cloreto de 1-hexadecilpiridínio 0.75% (HPC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) deixando em contato com o sedimento overnight (12-16h). No dia seguinte a solução foi centrifugado a $3000 \times g$ por 20 minutos novamente. Ao sedimento, foram adicionados 2mL de solução antimicrobiana contendo ácido nalidíxico (50mg/l) (Sigma-Aldrich,), vancomicina (50mg/l) (Sigma-Aldrich) e anfotericina B (150mg/l) (Cristália, Itapira, SP, Brasil), Em contato com a amostra durante 72 horas à temperatura ambiente antes da inoculação Alíquotas de 200µl foram inoculadas em quatro tubos de rosca contendo meio HEYM, sendo dois com micobactina *J* e dois sem o sideróforo, que auxilia na captação de ferro pela bactéria a partir do meio, o que é necessário para o crescimento de MAP

Em seguida, os tubos foram incubados à 37°C em posição inclinada por uma semana. Passado esse período, os tubos foram colocados em posição vertical e incubados por um mínimo de 16 semanas, com observações semanais do crescimento. Quando observado crescimento característico das colônias de MAP, o material foi submetido a coloração de Ziehl-Neelsen para a visualização dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), além da realização de PCR e do sequenciamento para certificação da mesma.

2.5- Reação de Polimerase em Cadeia Convencional (PCR)

2.5.1-Extração de DNA

Para extração de DNA foi utilizado o kit Wizard® Genomic DNA Purification, seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a 8°C para posterior realização do PCR. Nessa etapa foram realizados três protocolos diferentes de extração, todos contendo os passos de lise, precipitação proteica, precipitação do DNA e reidratação do DNA. Em um protocolo foi utilizada apenas lisozima, enquanto em outro utilizando a proteinase k e em um terceiro, utilizando a lise combinada de ambos agentes. De acordo com o agente de lise, também variaram outros elementos dos

protocolos, como tempo de ação, temperatura, entre outros, que podem ser verificados nos protocolos completos descritos no Anexo I.

Como controle positivo foi utilizado cultura de MAP K10 e cultura de MAP K10 acrescida de água a uma concentração final de $6,6 \times 10^5$ UFC/ml, aferida por um aparelho espectrofotômetro (Bio-tech ELx800, Winooski, EUA), afim de verificar a possível interferência dos componentes da água de torneira sob a extração do DNA. Todas as 20 amostras foram submetidas aos três protocolos diferentes de extração e ao PCR com o par de primers descrito.

Para extração de DNA das amostras de água foi utilizado 1mL da solução recuperada no processamento da amostra. A concentração de DNA final foi aferida utilizando NanoDrop Lite spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA). As amostras de água humana continham menos de 200 ng/ μ L e as amostras de animais continham de 200 a 300 ng/ μ L

2.5.2- PCR

Para a realização da técnica de PCR foi utilizado o kit Go Taq® Green Master Mix de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando-se o par de primers, e *ISMav2/F* e *ISMav2/B2* (Tabela 2), que amplifica um fragmento de 494pb. Cada reação teve um volume final de 25 μ l, sendo 12.5 μ l de mix, 1 μ l de cada primer, 6.5 μ l água nuclease free e 4 μ l de DNA extraído, e seguiu-se o programa disponível na Tabela 3. (Shin *et al*, 2004)

Para confirmar a identidade dos fragmentos amplificados, os amplicons foram purificados e sequenciados em ambas as direções no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) de Minas Gerais, situado na cidade de Pedro Leopoldo, de acordo com os protocolos de rotina da referida instituição, e as sequências obtidas foram alinhadas, editadas e comparadas com outras sequências depositadas no GenBank, utilizando o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Tabela 2-Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na detecção pela técnica de PCR.

Oligonucleotídeo	Referência	Sequência
<i>ISMav2/F</i>	Shin <i>et al.</i> (2004)	5'-GTGAGTTGTCCGCATCAGAT-3'
<i>ISMav2/B2</i>		5'-GCATCAAAGAGCACCTCGAC-3'

Tabela 3- Programa de PCR utilizado na detecção de DNA de MAP das amostras de água

Referência	Desnaturaçã o inicial	Nº. de ciclos	Ciclo	Extensão final
Shin et al. (2004)	94°C/4min	35	94°C/30s; 50°C/1min; 72°C/1min	72°C/7min

2.6-*Caracterização das propriedades*

As propriedades foram caracterizadas através da aplicação de um questionário (Anexo II) com o proprietário. 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, uma para o pesquisador e outra entregue ao entrevistado. Os questionários foram aplicados sempre pelo mesmo entrevistador, ao final dos procedimentos de coleta de amostras.

2.7-*Análise estatística*

A análise dos dados do estudo foi iniciada com a construção de banco de dados no programa Epi Info™ versão 3.5.3 (CDC, 2011). A primeira etapa da construção do banco de dados compreendeu a elaboração da máscara/espelho do banco de dados. Posteriormente, foi realizada à construção do banco de dados propriamente dita, com a inserção das respostas de cada questionário no programa, cuidadosamente, conferindo após cada questionário. A seguir foi realizada análise univariada, das variáveis.

Os resultados encontrados para os diferentes protocolos de extração foram comparados estatisticamente pela ANOVA e pelo teste de Tukey considerando $p < 0,05$.

3-Resultados e discussão

Quatro localidades tiveram resultados positivos para o cultivo das amostras de água de consumo animal.(Figura 2), nos quais foram visualizados bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR.) (figura 3)



Figura 2- Amostras de água para consumo animal inoculadas em meio Herold com gema de ovo Inoculadas com amstras de água para consumo animal. A:, tubo sem micobactina *J*. B e C tubos com micobactina *J* demonstrando crescimento típico de MAP:

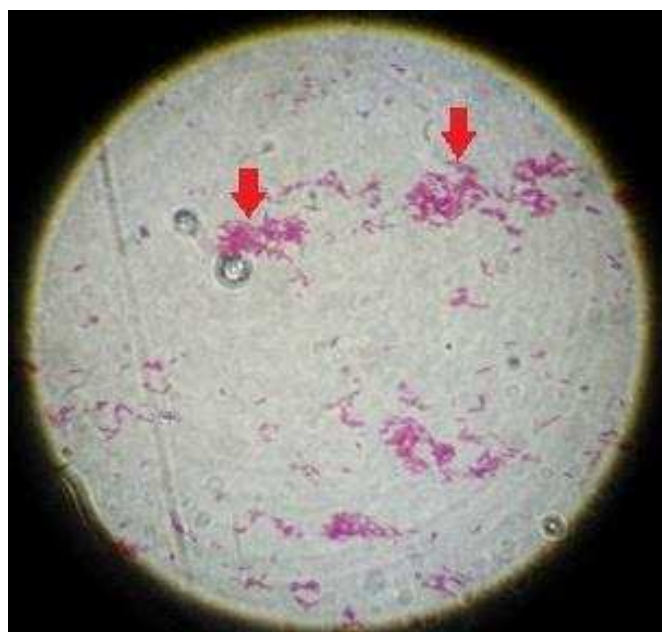


Figura 3- Esfregaço de colônias crescidas em meio Herold com gema de ovo, com micobactina *J*, a partir de amostras de água para consumo animal, corado com Ziehl Neelsen, seta demonstrando clumpins de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Aumento:1000x

Entre as amostras de água para consumo humano não foi verificado crescimento de colônias até o momento. Os tubos continuam em incubação uma vez que podem demorar até 20 meses para crescer, segundo Shankar *et al* (2010).

À PCR convencional foram encontrados resultados positivos para as mesmas, quatro amostras de água para consumo animal que demonstraram o crescimento no cultivo microbiológico e em uma quinta localidade, que não demonstrou crescimento no meio de cultura. O não crescimento de colônias para essa quinta propriedade e para as amostras de água para consumo humano dessas cinco localidades pode ser devido à reduzida quantidade de DNA nas amostras ou à formação de estruturas “spore like”, o que dificultari o crescimento de MAP em cultivo.

Para as amostras de consumo humano, foram encontrados resultados positivos para 30% das amostras.

Das localidades, 40% que demonstraram resultados positivos a PCR e ao cultivo das amostras de consumo animal, duas foram também positivas à PCR das amostras de água para consumo humano.

Devido a um acordo entre pesquisadores e proprietários, a origem das amostras não será discutida. Apesar disso é interessante ressaltar que, para uma determinada microrregião, as amostras coletadas de ambas as propriedades amostradas demonstraram a presença de MAP viável, indicando possível contaminação de um manancial comum. Sugere-se portanto, a investigação da fonte de contaminação, para eliminação da mesma.

A propriedade que demonstrou resultados positivos apenas PCR das amostras de água de consumo animal, demonstrou o mesmo resultado para as amostras de água de consumo humano

Para a confirmação desses resultados foi realizado o sequenciamento genético, que resultou em graus de identidade entre os isolados e MAP k10 que variaram de 92 à 99%. Esses resultados são compatíveis com o agente, em vista da alta especificidade do primer utilizado.

A identificação do agente em amostras de água para consumo humano e animal nas três propriedades sugere que a contaminação da mesma se deu

em sua origem (manancial) ou em seu armazenamento, possivelmente pelas fezes dos animais com a doença, de forma direta ou indiretamente.

Com relação aos diferentes protocolos, apesar de terem sido encontrados mais resultados positivos à extração com Lisozima (22,5%) quando comparada a proteinase k (10%) e a lise dos dois agentes combinados (7,5%), não houve diferença estatística a $p < 0,05$. Na literatura não se tem um protocolo padrão estabelecido de extração de DNA de MAP em amostras de água, o que faz com que os pesquisadores utilizem diferentes metodologias e agentes de lise dificultando a comparação dos resultados. Especialmente para MAP, o uso de um agente adequado para a lise das bactérias é importante, em virtude da sua parede espessa e a capacidade de formação de estruturas “spore like”

A partir dos dados obtidos na aplicação do questionário, pôde-se caracterizar as fazendas de uma forma geral, assim como comparar as frequências das variáveis entre fazendas positivas e negativas para MAP. Dessa forma, será apresentado o perfil geral das variáveis, seguido da discussão dos resultados daquelas que apresentaram resultados diferenciados quando comparados casos e controles e são de relevância do ponto de vista do ciclo do agente.

A análise de frequência considerando-se a detecção de MAP (PCR e cultivo) nas amostras de água para consumo animal (Tabelas 4 à 8) e os resultados para as amostras de consumo humano (Tabelas 9 a 12.).

Segundo os dados descritos, o perfil geral das propriedades pesquisadas foi de produtores com mais de três anos de experiência criando caprinos, com escolaridade até nível médio, e não associado à cooperativa. As propriedades são de até 100ha, cuja utilização para a criação dos animais não ultrapassa 20% da área, compartilhando o local com outras espécies animais.

Tabela 4- Variáveis relacionadas à propriedade e entrevistado segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo animal

Variáveis	Total n=10	Positivos (%)	Negativos (%)
Caprinocultura como atividade principal			
Sim	5 (50)	2(40)	3 (60)
Não	5 (50)	3(60)	2(40)
Há quanto tempo trabalha com caprinos			
Há mais de 3 anos	9 (90)	4(80)	5(100)
Menos de 3 anos	1 (10)	1(20)	0 (0,0)
Associado à cooperativa			
Sim	3 (30)	1 (20)	2 (40)
Não	7 (70)	4(80)	3(60)
Escolaridade do entrevistado			
Até nível médio	6 (60)	4(80)	2 (40)
Superior completo ou incompleto	4 (40)	1(20)	3(60)
Tamanho da propriedade			
Até 100ha	8 (80)	3 (60)	5(100)
Acima de 100ha	2(20)	2 (40)	0 (0,0)
Área utilizada para caprinocultura (%)			
Até 20%	7 (70)	5(100)	2 (40)
Acima de 20%	3 (30)	0 (0,0)	3(60)
Energia elétrica			
Sim	10 (100)	5(100)	5(100)
Não	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Há outras espécies			
Sim	10 (100)	5(100)	5(100)
Não	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Presença de bovinos			
Sim	4 (40)	3 (60)	1 (20)
Não	6 (60)	2 (40)	4 (80)
Presença de ovinos			
Sim	3 (30)	2 (40)	1 (20)
Não	7 (70)	3(60)	4 (80)
Presença de cães			
Sim	8 (80)	4 (80)	4 (80)
Não	2 (20)	1 (20)	1 (20)
Presença de equinos			
Sim	7 (70)	3 (60)	4 (80)
Não	3 (30)	2 (40)	1 (20)
Presença de galinhas e/ou patos			
Sim	7 (70)	3 (60)	4 (80)
Não	3 (30)	2 (40)	1 (20)

Os dados da Tabela 4 demonstram do ponto de vista geral que 90% dos proprietários trabalham com caprinocultura há mais de três anos, sendo que isso corresponde a 80% das propriedades positivas e 100% das negativas.

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.

Houve predominância de pequenas propriedades: 80% tinham menos de 100 hectares (em média, 10,03 hectares).

Quanto à distribuição das variáveis relacionadas à propriedade e ao entrevistado podemos notar que a maioria segue uma distribuição semelhante quando comparadas fazendas positivas e negativas para MAP em água para consumo animal. Excetua-se a escolaridade do entrevistado, a percentagem da área utilizada para a caprinocultura e a presença de bovinos.

Sobre a escolaridade do entrevistado, nota-se que 60% dos entrevistados possuíam apenas até o ensino médio, sendo que entre as fazendas onde há MAP 80%, dos entrevistados possui apenas até nível médio, enquanto entre as fazendas negativas 60% dos entrevistados possui nível superior completo ou incompleto. Nesse ponto, pode-se inferir que o maior nível de escolaridade estaria associado a práticas de manejo adequadas, em vista do maior esclarecimento dos indivíduos. Todos os entrevistados tinham pelo menos ensino fundamental completo e 40% iniciaram seus estudos no ensino superior, tendo sido concluído por 30%.

Das propriedades, 40% possuíam bovinos, estando em 60% das fazendas positivas, enquanto apenas 20% das fazendas positivas possui criação consorciada de bovinos. Nesse ponto a presença desses animais poderia influenciar na detecção de MAP na água, uma vez que esses também podem se infectar com o agente, eliminando a bactéria em suas fezes, contaminando o solo e as fontes de água.

Tabela 5- Variáveis econômicas e produtivas segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo animal

Variáveis	Total n=10	Positivos (%)	Negativos(%)
Tipo de exploração			
Leite	10 (100)	5 (100)	5 (100)
Carne	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Regime de criação			
Confinamento	10 (100)	5 (100)	5 (100)
Extensivo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Número total de animais			
acima de 200	6 (60)	4 (80)	2 (40)
até 200	4 (40)	1 (20)	3 (60)
Fêmeas adultas			
Até 150	6 (60)	3 (60)	3 (60)
Acima de 150	4 (40)	2 (40)	2 (40)
Machos adultos			
Até5	7 (70)	3 (60)	4 (80)
Mais que 5	3 (30)	2 (40)	1 (20)
Empregados na propriedade			
Mais que 3	3 (30)	2 (40)	1 (20)
Menos que 3	7 (70)	3 (60)	4 (80)
Animais identificados			
Sim	9 (90)	5 (100)	4 (80)
Não	1 (10)	0 (0,0)	1 (20)
Raça			
Saneen	5 (50)	2 (40)	3(60)
Pardo Alpino	1 (10)	0 (0,0)	1(20)
Mestiços	4 (40)	3 (60)	1(20)
Instalação			
Piso suspenso ripado	8 (80)	4 (80)	4 (80)
Uso de cama	2 (20)	1 (20)	1 (20)
Animais nascidos em um ano			
Acima de 80	6 (60)	4 (80)	2 (40)
Até 80	4 (40)	1 (20)	3 (60)
Animais mortos em um ano			
Até 5%	6 (60)	2 (40)	4 (80)
Acima de 5%	4 (40)	3 (60)	1 (20)
Presença de tanque de resfriamento			
Sim	9 (90)	5 (100)	4 (80)
Não	1 (10)	0 (0,0)	1 (20)
Animais em lactação (%)			
Acima de 40	7 (70)	4 (80)	3 (60)
Abaixo de 40	3 (30)	1 (20)	2 (40)
Período de lactação			
Até 300 dias	5 (50)	4 (80)	1 (20)
Acima de 300 dias	5 (50)	1 (20)	4 (80)
Produção diária de leite			
Até 100	5 (50)	3 (60)	2 (40)
De 100 a 150	2 (20)	1(20)	1 (20)
Acima de 150	3 (30)	1(20)	2 (40)
Produção média por animal			
2	6 (60)	2 (40)	4 (80)
3	2 (40)	1 (20)	1 (20)
4	2 (40)	2 (40)	0 (0,0)

De o perfil geral das propriedades segundo os aspectos econômicos e produtivos foi principalmente de propriedade produtoras de caprinos leiteiros sob regime de confinamento, com mais de 200 animais, sendo o total de fêmeas adultas de até 150 animais e mais de 5 machos. O número de empregados nas propriedades geralmente não ultrapassou 3 indivíduos, sendo os animais identificados, principalmente da raça Saanen, criados em piso suspenso ripado, havendo o nascimento de mais de 80 animais e mais de 5% dos animais mortos no período de um ano. As propriedades de uma forma geral possuíam tanque de resfriamento, e mais de 40% das fêmeas em lactação, com produção de cerca de 2 litros por animal por dia e de até 100 litros de leite diariamente na fazenda.

Sobre os aspectos econômicos e produtivos das propriedades nota-se que a distribuição é diferente quando considerado o número total de animais número de animais nascidos em um ano, a raça, o período de lactação e a produção média por animal em um dia (Tabela 5)

Quanto ao número de animais, 60% das fazendas pesquisadas apresentam um rebanho de pelo menos 200 animais, já quanto à presença de MAP em água de consumo animal, 80% das fazendas positivas possui número de animais maior que 200, enquanto apenas 40% das fazendas negativas possui esse número de animais. Com relação ao MAP, que é um agente infectocontagioso, a maior densidade populacional pode facilitar a sua transmissão e dificultar o controle, já que o grau de contaminação e o contato entre os animais se torna mais intenso. Isso poderia explicar essa distribuição, configurando um potencial fator de risco para MAP em amostras de água. O mesmo vale para o número de animais nascidos em um ano.

Quanto à raça, apenas 40% das fazendas criam animais mestiços, 50% criam animais da raça Saanen e outros 10% criam somente animais da raça Pardo Alpino. Em detalhe, 60% das fazendas positivas utiliza animais mestiços e 80% das fazendas negativas utilizam, animais da raça Saanen ou Pardo Alpino. Se for inferido que a utilização de animais mestiços estiver associada à compra de animais de diferentes origens enquanto a utilização de animais de

apenas uma raça indicar a compra de animais de menos localidades, a positividade poderia estar associada ao tráfego mais intenso de animais, de diferentes localidades, que resulta muitas vezes na inserção de patógenos nos rebanhos, sugerindo também um possível fator de risco para MAP em amostras de água.

Em cada propriedade havia entre 47 e 550 animais, com média de 165 e mediana de 134,5 animais, em uma distribuição amodal. 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.

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.

De acordo com as variáveis sanitárias, o perfil geral das propriedades foi de 2 ordenhas diárias, realização do consumo do leite produzido na própria fazenda, fervido, com presença de sala de ordenha, geralmente mecânica, com realização de higiene antes e depois do procedimento. A fonte de água dos locais foi principalmente poço, realizando a limpeza dos bebedouros pelo menos uma vez por semana, não praticando a vacinação dos animais, mas realizando a vermifugação de forma oral, e tendo a linfadenite caseosa como principal problema sanitário. A separação dos animais doentes, cura do umbigo, limpeza e desinfecção das instalações, destinação dos esterco ao capinzal ou milho também eram práticas recorrentes entre as propriedades, assim como o enterro dos animais mortos.

Tabela 6- Variáveis sanitárias segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo animal

Variáveis	Total n=5	Positivos (%)	Negativos (%)
Ordenhas por dia			
2	10 (100)	5 (100)	5 (100)
O leite é consumido em casa			
Sim	9 (90)	4 (80)	5 (100)
Não	1 (10)	1 (20)	0 (0,0)
Realiza a fervura para consumo			
Sim	7 (77,77)	3 (75)	4 (80)
Não	2 (22,22)	1 (25)	1 (20)
Sala de ordenha			
Sim	9 (90)	5 (100)	4 (80)
Não	1 (10)	0 (0,0)	1 (20)
Ordenha mecânica			
Sim	7 (70)	4 (80)	3 (60)
Não	3 (30)	1 (20)	2 (40)
Higiene na ordenha (pré e pós dipping)			
Sim	8 (80)	5 (100)	3 (60)
Não	2 (20)	0 (0,0)	2 (40)
Fonte da água utilizada para consumo dos animais e humanos			
Poço	5 (50)	3 (60)	2 (40)
Nascente ("mina")	3 (30)	2 (40)	1 (20)
Abastecimento público	2 (20)	0 (0,0)	2(20)
Limpeza dos bebedouros			
Ao menos uma vez por semana	7 (70)	3 (60)	4 (80)
Menos de uma vez por semana	3 (30)	2 (40)	1 (20)
Realiza vacinação			
Sim	4 (40)	3 (60)	1 (20)
Não	6 (60)	2 (40)	4 (80)
Realiza vermifugação			
Via oral	9 (90)	5 (100)	4 (80)
Via injetável	1 (10)	0 (0,0)	1 (20)
Problemas sanitários			
Linfadenite: Sim	7 (70)	3 (60)	4 (80)
Não	3 (30)	2 (40)	1 (20)
Mastite: Sim	3 (30)	2 (40)	1 (20)
Não	7 (70)	3 (60)	4 (80)
Área de isolamento dos animais doentes			
Sim	7 (70)	3 (60)	4 (80)
Não	3 (30)	2 (40)	1 (20)
Realiza cura do umbigo ao nascimento			
Sim	9 (90)	4 (80)	5 (100)
Não	1 (10)	1 (20)	0 (0,0)
Limpeza e desinfecção das instalações			
Sim	8 (80)	3 (60)	5 (100)
Não	2 (20)	2 (40)	0 (0,0)
Destino dos esterco			
Capinzal ou milharal	8 (80)	4 (80)	4 (80)
Plantação de café	2 (20)	1 (20)	1 (20)
Descarte de animais mortos			
Enterra	8 (80)	3 (60)	5 (100)
Outro	2 (20)	2 (40)	0 (0,0)

Sobre os aspectos sanitários (Tabela 6) pode-se perceber que, quanto a fonte de abastecimento de água das localidades, apenas 20% possuíam abastecimento público com fornecimento de água tratada, das demais, 50% utilizam água de poço artesiano ou semi-artesiano e 30% utilizam água de nascentes. A fonte de abastecimento de água difere ainda, entre fazendas positivas e negativas. Somente utilizam abastecimento público fazendas negativas, enquanto a maioria das fazendas positivas utiliza poço como fonte de água. Nesse ponto vale ressaltar que MAP não foi detectado na água tratada, o que já era um resultado esperado, já que esta passa por processos que visam à remoção de micro-organismos patogênicos. Outro ponto que contribuiria para a detecção do agente em amostras de água provenientes de poço ou nascente é a contaminação dessa água com fezes dos animais infectados, que contaminam o solo e a água, que não passa por nenhum tratamento antes de ser consumida. (Pickup *et al*, 2006)

Os animais eram identificados individualmente em nove propriedades, de diversas maneiras: apenas com coleiras (44,44%), apenas com brincos (11,11%), apenas com tatuagem (22,22%) ou com tatuagem e coleira (22,22%). A identificação individual dos animais é importante para o controle zootécnico e sanitário dos animais. Com estes controles, é possível ter o histórico de doenças de cada animal e o seu desempenho produtivo e reprodutivo.

A taxa de mortalidade entre os animais adultos variou bastante. Um dado importante é que 30% das propriedades perdiam pelo menos 5% dos seus animais adultos ao ano, o que é considerado uma taxa elevada. Este valor pode ser devido a erros de manejo no que se refere ao controle e prevenção de doenças.

Outro dado relacionado aos aspectos sanitários descrito na Tabela 6 é o consumo do leite produzido nas própria propriedade, sendo que 90% das localidades realiza a prática e desses, apenas 77,7% fazem a fervura do leite para o consumo e o restante consome cru. Diante do potencial zoonótico não esclarecido de MAP, essa é uma prática desaconselhável, que favoreceria a contaminação pelo agente.

Tabela 7- variáveis nutricionais segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo animal

Variáveis	Total n=10	Positivos	Negativos
Realiza secagem dos animais			
Sim	10 (100)	5 (100)	5 (100)
Não	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Produz ou compra os alimentos			
Produz	3 (30)	0 (0,0)	3 (60)
Produz e compra	7 (70)	5 (100)	2 (40)
Aleitamento dos filhotes			
Leite de cabra	5 (50)	3 (60)	2 (40)
Leite de vaca	5 (50)	2 (40)	3 (60)
Aleitamento dos filhotes			
Artificial	100 (100)	5 (100)	5 (100)
Colostro tratado			
Sim	5 (50)	2 (40)	3 (60)
Não	5 (50)	3 (60)	2 (40)

Do ponto de vista geral as fazendas realizavam a secagem dos animais, a produção e compra dos alimentos e aleitamento dos neonatos de maneira artificial. (Tabela 7). Além disso, nota-se que 70% das localidades realizam a compra e a produção dos alimentos fornecidos para os animais na propriedade, das fazendas negativas 60% produzem seu alimento, enquanto as fazendas positivas produzem e compram o alimento fornecido aos animais. O capinzal ou milharal dessas propriedades é irrigado com a mesma água utilizada para consumo humano e animal nessas propriedades nas quais o agente foi detectado. Já que MAP é um agente resistente a condições de estresse, os alimentos podem ser contaminados pela água contendo MAP e infectar animais durante o consumo desse milho ou capim. Porém, o alimento comprado também pode servir como veículo de MAP e outros agentes, inserindo os mesmos nos rebanhos.

Já o aleitamento dos neonatos é realizado em 70% das propriedades com leite de vaca, apesar disso, 60% das as fazendas positivas utilizam leite de cabra, e o inverso ocorre entre as fazendas negativas Além disso, a maior parte das fazendas positivas não trata o colostro, enquanto 60% das fazendas negativas realiza algum tipo de tratamento. O não tratamento térmico do

colostro pode ser um fator que influenciaria a ocorrência de MAP na água para consumo dos animais, pois caso contaminado, seria fonte de infecção para novos animais que, conseqüentemente, contaminariam a água através das fezes contendo o agente. (Costa *et al*, 2010)

Tabela 8- Variáveis reprodutivas segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo animal

Variáveis	Total n=10	Positivos(%)	Negativos (%)
Utilização de inseminação			
Sim	3 (30)	2 (40)	1 (20)
Não	7 (70)	3 (60)	4 (80)
Separação dos animais perto do parto			
Sim	4 (40)	3 (60)	1 (20)
Não	6 (60)	2 (40)	4(80)

Quanto aos aspectos reprodutivos (Tabela 8), nota-se que 60% das propriedades não realizam a prática da separação dos animais perto do parto, porém, uma pequena diferença com relação às fazendas negativas e positivas ocorre: em 60% das propriedades onde se detectou o agente nas amostras de água para consumo animal, é realizada a separação dos animais próximo ao parto, enquanto 80% das propriedades que foram negativas não realiza o procedimento. A partir disso pode-se sugerir que a área de parição desses animais pode estar contaminada com MAP e servindo de via de transmissão do agente, podendo infectar novos animais que irão contaminar novamente o solo, a água e novos animais, estabelecendo assim um ciclo.

Já a análise univariada considerando-se a ocorrência de MAP nas amostras de água para consumo humano resultou na distribuição apresentada nas tabelas 9 à 13. Observa-se que, apesar de 50% das propriedades apresentarem a caprinocultura como atividade principal, 66,6% das fazendas positivas não tem a caprinocultura como atividade principal, e o inverso ocorre com as fazendas onde o agente não foi identificado. Não sendo a atividades principal do proprietário, a atenção dada ao manejo sanitário pode ser menor, resultando na ocorrência de doenças infectocontagiosas como a paratuberculose. Quanto a escolaridade, a distribuição segue a mesma

tendência encontrada com mostras de água para consumo animal, que é de menor escolaridade nas propriedades positivas. (Tabelas 5 e 9)

A presença de equinos é outra variável relacionada à propriedade que demonstra uma distribuição diferenciada entre propriedade positivas para MAP em água para consumo humano. No total, 70% das fazendas possuem o animal, enquanto 6 (85,7)% das fazendas negativas possuem o equinos, enquanto apenas 1 (33,3)% das positivas tem o animal. Essa mesma distribuição ocorre para presença de galinhas e/ou patos nas propriedades

Tabela 9- Variáveis relacionadas a propriedade e ao entrevistado segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo humano

Variáveis	Total n=5	Positivos (%)	Negativo (%)
Caprinocultura como atividade principal			
Sim	5 (50)	1 (33,3)	4 (57,2)
Não	5 (50)	2 (66,6)	3 (42,8)
Há quanto tempo trabalha com caprinos			
Menos de 3 anos	1 (10)	1 (33,3)	0 (0,0)
Há mais de 3 anos	9 (90)	2 (66,6)	7 (100)
Associado à cooperativa			
Sim	7 (70)	3 (100)	4 (57,2)
Não	3 (30)	0 (0,0)	3 (42,8)
Escolaridade do entrevistado			
Até nível médio	6 (60)	3 (100)	3 (42,8)
Superior completo ou incompleto	4 (40)	0 (0,0)	4 (57,2)
Tamanho da propriedade			
Até 100ha	9 (90)	3 (100)	6 (85,7)
Acima de 100ha	1 (10)	0 (0,0)	1 (14,3)
Área utilizada para caprinocultura (%)			
Até 20%	7 (70)	3 (100)	4 (57,2)
Acima de 20%	3 (30)	0 (0,0)	3 (42,8)
Energia elétrica			
Sim	10 (100)	3 (100)	7 (100)
Não	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Há outras espécies			
Sim	10 (100)	3 (100)	7 (100)
Não	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Presença de bovinos			
Sim	6 (60)	2 (66,6)	4 (57,2)
Não	4 (40)	1(1 (33,3)	3 (42,8)
Presença de ovinos			
Sim	3 (30)	1 (33,3)	2 (28,6)
Não	7 (70)	2 (66,6)	5(5 (71,4)
Presença de cães			
Sim	8 (80)	2 (66,6)	6 (85,7)
Não	2 (20)	1(1 (33,3)	1 (14,3)
Presença de equinos			
Sim	7 (70)	1 (33,3)	6 (85,7)

Não	3 (30)	2 (66,6)	1 (14,3)
Presença de galinhas e/ou patos			
Sim	7 (70)	1 (33,3)	6 (85,7)
Não	3 (30)	2 (66,6)	1 (14,3)

Tabela 10- Variáveis econômicas e produtivas segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo humano

Variáveis	Total n=10	Positivo (%)	Negativo (%)
Tipo de exploração			
Leite	10 (100)	3 (100)	7(100)
Carne	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Regime de criação			
Confinamento	10 (100)	3 (100)	7(100)
Número total de animais			
acima de 200	6	2 (66,6)	4 (57,2)
até 200	4	1 (33,3)	3 (42,8)
Fêmeas adultas			
Até 150	9 (90)	2 (66,6)	7(100)
Acima de 150	1 (10)	1 (33,3)	0 (0,0)
Machos adultos			
Até5	5 (50)	2 (66,6)	3 (42,8)
Mais que 5	5 (50)	1 (33,3)	4 (57,2)
Empregados na propriedade			
Mais que 3	3 (30)	1 (33,3)	2 (28,6)
Menos que 3	7 (70)	2 (66,6)	5 (71,4)
Animais identificados			
Sim	9 (90)	3 (100)	6 (85,7)
Não	1 (10)	0 (0,0)	1 (14,3)
Raça			
Saneen	5 (50)	1 (33,3)	4 (57,2)
Pardo Alpino	1 (10)	0 (0,0)	1 (14,3)
Outro	4 (40)	2 (66,6)	2 (28,6)
Instalação			
Piso suspenso ripado	8 (80)	2 (66,6)	6 (85,7)
Uso de cama	2 (20)	1 (33,3)	1 (14,3)
Animais nascidos em um ano			
Acima de 80	4 (40)	2 (66,6)	2 (28,6)
Até 80	6 (60)	1 (33,3)	5 (71,4)
Animais mortos em um ano			
Até 5%	6 (60)	2 (66,6)	4 (57,2)
Acima de 5%	4 (40)	1 (33,3)	3 (42,8)
Presença de tanque de resfriamento			
Sim	9 (90)	3 (100)	6 (85,7)
Não	1 (10)	0 (0,0)	1 (14,3)
Animais em lactação (%)			
Acima de 40	7 (70)	2 (66,6)	5 (71,4)
Abaixo de 40	3 (30)	1 (33,3)	2 (28,6)
Período de lactação			
Até 300 dias	5 (50)	2 (66,6)	3 (42,8)
Acima de 300 dias	5 (50)	1 (33,3)	4 (57,2)
Produção diária de leite			
Até 100	5 (50)	2 (66,6)	3 (42,8)
De 100 a 150	3 (30)	1 (33,3)	2 (28,6)
Acima de 150	2 (20)	0 (0,0)	2 (28,6)

Produção média por animal			
2	6 (60)	2 (66,6)	4 (57,2)
3	2 (20)	1 (33,3)	1 (14,3)
4	2 (20)	0	2 (28,6)

Com relação as variáveis econômicas e produtivas dispostas na tabela 10, verifica-se que 50% das fazendas possuem um o número de machos adultos de pelo menos 5 animais, apesar disso, 57,2% das propriedades negativas possuem mais de 5 animais e em apenas 33,3% das positivas isso ocorre. Possuindo um número de animais maior, a probabilidade de uma fêmea ser coberta por um macho infectado é reduzida, quando comparada a propriedade com menos animais, no caso do uso de monta natural.

Já com relação à distribuição das frequências das raças, do número de animais nascidos e do número de dias em lactação a tendência é a mesma que ocorre para as fazendas positivas para o agente na água para consumo animal.(tabelas 6 e 10).

Com relação aos aspectos sanitários (Tabela 11) a maioria das variáveis apresentam distribuição semelhante entre propriedades positivas e negativas. Com relação a limpeza dos bebedouros, verifica-se que 70% das propriedades realizam ao menos uma limpeza dos bebedouros por semana, as limpezas tendem a ser menos frequentes entre as fazendas positivas, onde 66,6% das propriedades realizam a limpeza com uma frequência menor que 1 vez por seman, enquanto 85,7% da propriedades negativas realizam ao menos 1 limpeza por semana. Isso seria um ponto que poderia favorecer a detecção do agente na água. Além disso, a limpeza e desinfecção das instalações deixa de ser realizada entre as fazendas positivas, sendo que em 66,6% dessas, o procedimento é realizado e em 100% das negativas a prática é realizada. De uma forma geral, a limpeza é feita em 80% das localidades.

Quanto ao descarte de animais mortos, 80% das propriedades pesquisadas realizam o enterro de animais, sendo que 100% das fazendas negativas para MAP em água de consumo humano realizam o procedimento e apenas 66,6% das positivas dão esse destino aos animais mortos. O descarte inadequado das carcaças de animais mortos certamente irá facilitar a proliferação de agentes patogênicos.

Tabela 11- Variáveis sanitárias segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo humano

Variáveis	Total n=10	Positivos (%)	Negativos (%)
Ordenhas por dia			
2	10 (100)	100	100
O leite é consumido em casa			
Sim	9 (90)	2 (66,6)	7 (100)
Não	1 (10)	1 (33,3)	0 (0,0)
Realiza a fervura para consumo			
Sim	7 (77,77)	1(50)	6 (85,7)
Não	2 (22,22)	1(50)	1 (14,3)
Sala de ordenha			
Sim	9 (90)	3 (100)	6 (85,7)
Não	1 (10)	0 (0,0)	1 (14,3)
Ordenha mecânica			
Sim	6 (60)	2 (66,6)	4 (57,2)
Não	4 (40)	1 (33,3)	3 (42,8)
Higiene na ordenha (pré e pós dipping)			
Sim	8 (80)	3 (100)	5 (71,4)
Não	2 (20)	0 (0,0)	2 (28,6)
Fonte da água utilizada para consumo dos animais e humanos			
Poço (raso)	5 (50)	2 (66,6)	3 (42,8)
Nascente ("mina")	3 (30)	1 (33,3)	2 (28,6)
Abastecimento público	2 (20)	0	2 (28,6)
Limpeza dos bebedouros			
Ao menos uma vez por semana	7 (70)	1 (33,3)	6 (85,7)
Menos de uma vez por semana	3 (30)	2 (66,6)	1 (14,3)
Realiza vacinação			
Sim	4 (40)	1 (33,3)	3 (42,8)
Não	6 (60)	2 (66,6)	4 (57,2)
Realiza vermifugação			
Via oral	9 (90)	3 (100)	6 (85,7)
Via injetável	1 (10)	0 (0,0)	1 (14,3)
Problemas sanitários			
Linfadenite: Sim	7 (70)	1 (33,3)	6 (85,7)
Não	3 (30)	2 (66,6)	1 (14,3)
Mastite: Sim	3 (30)	1 (33,3)	2 (28,6)
Não	7 (70)	2 (66,6)	5 (71,4)
Área de isolamento dos animais doentes			
Sim	7 (70)	2 (66,6)	5 (71,4)
Não	3 (30)	1 (33,3)	2 (28,6)
Realiza cura do umbigo ao nascimento			
Sim	9 (90)	2 (66,6)	7 (100)
Não	1 (10)	1 (33,3)	0 (0,0)
Limpeza e desinfecção das instalações			
Sim	8 (80)	1 (33,3)	7(100)
Não	2 (20)	2 (66,6)	0 (0,0)
Destino dos esterco			
Capinzal ou milharal	8 (80)	2 (66,6)	6 (85,7)
Plantação de café	2 (20)	1 (33,3)	1 (14,3)
Descarte de animais mortos			
Enterra	8 (80)	1 (33,3)	7 (100)
Outro	2 (20)	2 (66,6)	0 (0,0)

Tabela 12 Variáveis nutricionais segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo humano

Variáveis	Total n=10	Positiva (%)	Negativo (%)
Realiza secagem dos animais			
Sim	10 (100)	3 (100)	7(100)
Produz ou compra os alimentos			
Produz	2 (20)	0 (0,0)	2 (28,6)
Produz e compra	8 (80)	3 (100]	5 (71,4)
Aleitamento dos filhotes			
Leite de cabra	5 (50)	3(100)	2 (28,6)
Leite de vaca	5 (50)	0 (0,0)	5 (71,4)
Aleitamento dos filhotes			
Artificial	10 (100)	3 (100)	7 (100)
Colostro tratado			
Sim	1 (10)	1 (33,3)	4 (57,2)
Não	2 (20)	2 (66,6)	3 (42,8)

Quanto aos aspectos nutricionais (Tabela 12) a distribuição entre propriedades positivas e negativas é semelhante ao verificado para as fazendas positivas para MAP em água para consumo animal (tabelas 8 e 12), excetuando-se o aleitamento dos filhotes, que é realizado com leite de cabra nas propriedades positivas e principalmente com leite de vaca (71,4) em propriedades negativas. Também a distribuição da variável colostro tratado é diferenciada, sendo que duas (66,6%) das fazendas positivas não realiza tratamento e quatro (57,2%) das negativas realiza. Esse ponto merece destaque quando considerada a presença de MAP nas amostras, pois o colostro é umas das principais formas que os animais se tornam infectados, e infectados serão responsáveis pela contaminação do solo, da água e de outros animais.

Tabela 13 Variáveis reprodutivas segundo positividade para MAP em amostras de água para consumo humano

Variáveis	Total n=10	Proporção (%)	Proporção (%)
Utilização de inseminação			
Sim	3 (30)	1 (33,3)	2 (28,6)
Não	7 (70)	2 (66,6)	5 (71,4)
Separação dos animais perto do parto			
Sim	4 (40)	2 (66,6)	2 (28,6)
Não	6 (60)	1 (33,3)	5 (71,4)

Quanto à separação perto do parto ocorre a mesma distribuição descrita segundo a positividade para MAP em amostras de água para consumo animal. (Tabelas 9 e 13)

A análise univariada aponta possíveis fatores de risco, que se destacaram. Para a confirmação desses fatores é necessária a realização de um estudo epidemiológico do tipo transversal ou caso-controle avaliando o status de exposição dos animais das propriedades para as mesmas variáveis.

Os resultados da PCR e cultivo microbiológico indicam o papel da água na manutenção do agente nos rebanhos como via de transmissão da bactéria. Além disso, a presença do agente nos rebanhos, a identificação de MAP em água parece ser uma ferramenta de diagnóstico eficiente, na predição do status do rebanho, visto que a presença do agente em sangue e fezes foi levantada por um estudo paralelo realizado simultaneamente pela mesma equipe de pesquisas, nos mesmos rebanhos e animais positivos não foram identificados em todas as propriedades em que houve a presença do agente na água. Isso provavelmente ocorre, pois o agente é resistente ao ambiente, podendo sobreviver a condições de estresse, como em ambientes aquáticos. Essas características permitem que o uso desse tipo de amostra identifique se há ou não circulação do agente com mais eficiência do que a detecção em fezes ou leite, pois a presença na água não é dependente da eliminação intermitente do agente,. Isso quer dizer que caso o animal com paratuberculose contamine a água, o agente pode ser detectado na mesma durante um longo período, no qual o agente pode não estar mais sendo eliminado nas fezes dos animais.

As fezes, sangue, leite ou outro espécime contaminado com o agente irão contaminar o solo e os cursos d'água podendo, dessa forma, contaminar humanos através da ingestão de água e outros produtos contaminados, e a identificação do agente nesse estudo, através de PCR em amostras de água para consumo humano apenas reforçam essa hipótese.

Com relação a estabelecimentos criadores de caprinos leiteiros, a contaminação de MAP no rebanho é ainda mais difícil de ser detectada, já que os animais doentes não demonstram sinais clínicos do agravo ou os

demonstram de forma branda, levando ao proprietário a não investigar o patógeno entre seus animais e muito menos em amostras de água.

Apesar da água ser uma forma importante de disseminação de agentes infecciosos, a pesquisa de patógenos em propriedades pecuaristas não é comum e os tal importância parece não ser compreendida, sendo a água muitas vezes entendida como inócua.

Esse é o primeiro relato sobre a presença de MAP viável em amostras de água para consumo animal em fazendas de caprinos leiteiros. Também se trata da primeira identificação do agente em amostras de água para consumo humano.

4- Conclusão

- MAP foi identificado em amostras de água para consumo humano e animal em propriedade de caprinocultura leiteira da Zona da Mata Mineira.
- A análise univariada aponta possíveis fatores de risco, que se destacaram na análise univariada, como o maior número de animais nascidos em um ano e a maior densidade populacional dos rebanhos. Para a confirmação desses fatores é necessária a realização de um estudo epidemiológico do tipo transversal ou caso-controle avaliando o status de exposição dos animais das propriedades para as mesmas variáveis.

ANEXO I Protocolos de Extração de DNA

Protocolos de Extração de DNA utilizados.

Extração de DNA utilizando lisozima:

- Centrifugar de 13.000 a 16.000g por 2 minutos
- Descarte o sobrenadante
- Ressuspender o pellet em 480microlitros de EDTA (mM)
- Adicionar 120 microlitros de solução lítica (lisozima)
- Incubar por 30-60 minutos a 37°C
- Centrifugar de 13.000 a 16.000g por 2 minutos
- Descarte o sobrenadante
- Lise células: adicione 600 microlitros de solução de lise nuclear. Pipete gentilmente para misturar
- Incube por 5 minutos a 80°C e então resfrie a temperatura ambiente
- Adicione 3 microlitros de solução de RNase e incube a 37°C por 15 a 60 minutos e então resfrie a temperatura ambiente
- Precipitação protéica: adicione 200microlitros de solução de precipitação proteica. Vortexar rapidamente
- Incubar em gelo por 5 minutos
- Centrifugar de 13.000 a 16.000g por 3 minutos
- Transfira o sobrenadante para um novo tubo contendo 600microlitros de isopropanol. Misture.
- Centrifugar de 13.000 a 16.000g por 2 minutos
- Descarte o sobrenadante
- Adicione 600 microlitros de etanol gelado
- Aspire o sobrenadante
- Descarte o sobrenadante
- Adicione 600 microlitros de etanol gelado
- Aspire o sobrenadante
- Deixe secar ao ar por 15 minutos

- Reidrate o pellet com 100microlitros de solução de reidratação de DNA por 1hora a 65°Cou a 4C overnight.

Extração de DNA utilizando proteinase K:

- Centrifugar de 13.000 a 16.000g por 2 minutos
- Descarte o sobrenadante
- Adicione 40microlitros de proteinase K e 360microlitros de solução de lise nuclear
- Incubar a 55°C overnight
- Incubar por 95°C por 10 minutos para parada da reação
- Adicione 200microlitros de solução de precipitação protéica. Vortexar rapidamente.
- Incubar em gelo por 15 minutos
- Centrifugar de 13.000 a 16.000g por 3 minutos
- Transfira o sobrenadante para um novo tubo contendo 600microlitros de isopropanol. Misture.
- Centrifugar de 13.000 a 16.000g por 2 minutos
- Descarte o sobrenadante
- Adicione 600 microlitros de etanol gelado
- Aspire o sobrenadante
- Descarte o sobrenadante
- Adicione 600 microlitros de etanol gelado
- Aspire o sobrenadante
- Deixe secar ao ar por 15 minutos
- Reidrate o pellet com 100microlitros de solução de reidratação de DNA por 1hora a 65°Cou a 4C overnight.

Extração de DNA utilizando lisozima e proteinase K

- Centrifugar de 13.000 a 16.000g por 2 minutos
- Descarte o sobrenadante
- Ressuspender o pellet em 480microlitros de EDTA (mM)

- Adicionar 120 microlitros de solução lítica (lisozima)
- Incubar por 30-60 minutos a 37°C
- Centrifugar de 13.000 a 16.000g por 2 minutos
- Descarte o sobrenadante
- Adicione 40microlitros de proteinase K e 360microlitros de solução de lise nuclear
- Incubar a 55°C overnight
- Incubar por 95°C por 10 minutos para parada da reação
- Adicione 200microlitros de solução de precipitação protéica. Vortexar rapidamente.
- Incubar em gelo por 15 minutos
- Centrifugar de 13.000 a 16.000g por 3 minutos
- Transfira o sobrenadante para um novo tubo contendo 600microlitros de isopropanol. Misture.
- Centrifugar de 13.000 a 16.000g por 2 minutos
- Descarte o sobrenadante
- Adicione 600 microlitros de etanol gelado
- Aspire o sobrenadante
- Descarte o sobrenadante
- Adicione 600 microlitros de etanol gelado
- Aspire o sobrenadante
- Deixe secar ao ar por 15 minutos
- Reidrate o pellet com 100microlitros de solução de reidratação de DNA por 1 hora a 65°C ou a 4C overnight.

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: _____ Frequência: _____
- 42- Quais são os principais problemas sanitários encontrados?
 Anemia
 Edema de barbela
 Diarreia
 Aborto
 Mastite
 Caroço (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 Frequência: _____
 Como? _____
- 46- Qual o destino dos esterco? _____
- 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

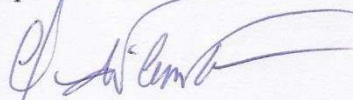
Anexo III Aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais

CERTIFICADO

A Comissão de Ética para Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 12/2013, intitulado “*Paratuberculose e Artrite-encefalite caprina em propriedades leiteiras do Estado de Minas Gerais: identificação, determinação dos fatores de risco e ações interventivas/participativas*”, coordenado pela professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, do Departamento Veterinária, está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 23/05/2013, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 12/2013, named “*Paratuberculosis and caprine arthritis in dairy farms in the state of Minas Gerais: identification, determination of risk factors and interventive actions/participatory*” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on May, 23, 2013 approved this process. This certificate expires in 12 months.



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

REFERÊNCIAS

Beumer, A; King,D;Donohue,M; Mistry, J; Covert,T E Pfaller, S, Applied And Environmental Microbiology, Vol 76 No21,Nov. 2010, P. 7367–7370

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-Bp, 29/09 A 03/10/2003. 2003.

Carvalho, I.A., Pietralonga, P.A.G., Schwarz, D. G. G. , Faria, A.C.S., Moreira, M.A.S. Short Communication: Recovery Of Viable *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* From Retail Pasteurized Whole Milk In Brazil. J. Dairy Sci. 95; P:6946–6948, 2012.

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.

Costa, J.C.M.; Pieri, F.A.; Souza, C.F.; Espescht, I.F.; Felipe, A.G.; Santos, G.M.; Tobias, F.L.; Silva Júnior, A.; Moreira, M.A.S. Levantamento Sorológico De *Mycobacterium avium* Subesp. *Paratuberculosis* Em Bovinos Leiteiros No Estado Do Espírito Santo. Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia, V.62 (6), P.1491-1494, 2010.

Dubeuf, J.P., Morand-Fehr, P., Rubino, R., 2004. Situation, changes 605 and future of goat industry around the world. *Small Rumin. Res.* 606 51, 165–173. 2004

Farias, J.L. De S.; Araújo, M.R.A. De; Lima, A.R.1; Alves, F.S.F.1; Oliveira, L.S. E Souza, H.A. De. In: Análise Socioeconômica De Produtores Familiares De Caprinos E Ovinos No Semiárido Cearense, Brasil. *Arch. Zootec.* 63 (241) P- 13-24. 2014.

Lamont, E.A., Bannantine, J.P., Armién, A., Ariyakumar, D.S. And Sreevatsan, S. Identification And Characterization Of A Spore-Like Morphotype In Chronically Starved *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis* Cultures. *Plos One*, 7 (1):E30648. (2012) Doi: 10.1371/Journal.Pone.0030648

Pickup, R. W.; Rhodes, G.; Arnott, S.; Sidi-Boumedine, K.; Bull, T. J.; Weightman, A.; Hurley, M E Hermon-Taylor- *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* In The Catchment Area And Water Of The River Taff In South Wales, United Kingdom, And Its Potential Relationship To Clustering Of Crohn's
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Apr. 2005, p. 2130–2139
Vol. 71, No. 4 doi:10.1128/AEM.71.4.2130–2139.2005

Pierce E.S. - Possible Transmission Of *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* Through Potable Water: Lessons From An Urban Cluster Of Crohn's Disease- Gut Pathogens– P. 1-17, 2009

Mishina D, Katsel P, Brown St, On The Etiology Of Crohn Disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:9816–20.

Marsh, I., R. Whittington, and D. Cousins. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. Mol. Cell. Probes 13:115-126. 1999.

Sweeney, R. W. Transmission Of *Paratuberculosis*. Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice, V.12, N.2, P.305-312. 1996.

Shin S.J., Chang Y.F., Huang C., Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in culture. J. Vet. Diagn. Invest. 2004;16(2):116–120.

Whan L. B. Gran I.R. Bactericidal Effect Of Chlorine On *Mycobacterium Paratuberculosis* In Drinking Water. Letters In Applied Microbiology. V.33, N.3, P.227-231, 2001

Whittington, RJ; Marsh, IB; Whitlock, RH, "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", MOL CELL PR, 15(3), 2001, pp. 139-145

CAPÍTULO 3- Fatores de risco para a presença de *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* em amostras de biópsias intestinais humanas

**ESPESCHIT, I.F.; CARVALHO, I. A.; OLIVEIRA, J. F.; SOUZA, M.C.C; VALÊNCIO, A;
FERRARI, M.L.A.; MOREIRA, M.A.S.**

Resumo

Doença de Johne ou paratuberculose é uma enterite granulomatosa crônica, causada pelo bacilo *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) caracterizada por diarreia persistente e perda de peso progressiva e que acomete principalmente ruminante. MAP é também frequentemente isolado a partir de amostras de pacientes humanos, com doenças intestinais, principalmente aqueles portadores da doença de Crohn (DC), uma doença inflamatória intestinal crônica e eventualmente granulomatosa, de etiologia e cura desconhecidas. O envolvimento de MAP na patogênese da DC e de outras doenças intestinais não está esclarecido. Essa configuração demonstra a importância dos estímulos ambientais no desenvolvimento do quadro, associada à detecção de MAP em alimentos como queijos, leite pasteurizado e água para consumo indicam a necessidade da pesquisa de fatores associados à presença do agente em intestino humano. O objetivo do estudo foi verificar comportamentos, hábitos e outros fatores que possam influenciar a ocorrência de MAP em amostras de biópsias intestinais humanas, de pacientes com DC, Retocolite Ulcerativa e pacientes não portadores de Doenças Inflamatórias intestinais (DII). Foi realizado um estudo caso-controle não pareado com objetivo de identificar possível associação entre a variável desfecho/ dependente presença de MAP em amostras de biópsias intestinais e variáveis independentes/exposições de ordem sanitária socioeconômica entre outras. A amostragem foi de conveniência em virtude da necessidade dos resultados de um estudo anterior. A população de origem é a população de pacientes atendidos no Instituto Alpha de Gastrenterologia situado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). O Instituto, considerado centro de referência na especialidade, atende pacientes de diversas regiões do estado de Minas Gerais. Casos e controles foram selecionados da população de pacientes atendidos no local, que realizaram o exame de colonoscopia entre os anos de 2009 e 2011, no qual as biópsias foram coletadas. Dos participantes, 57 são portadores doença de Crohn, 38 de Retocolite Ulcerativa 53 com outras indicações de colonoscopia. Foram denominados casos, os oito pacientes cujas amostras de biópsias intestinais continham DNA de MAP, detectado pela técnica da Reação de Poli-merase em Cadeia. Sendo os demais considerados casos, independente do diagnóstico recebido. O questionário pesquisou questões sobre a doença, tratamentos realizados, sintomas e intervenções anteriores, além de características socioeconômicas, presença de agravos intestinais entre os familiares, para verificação de variáveis associadas à presença do micro-organismo e o histórico familiar dos agravos. Também foram verificadas condições de saneamento e higiene desfavoráveis, consumo de leite e derivados pasteurizados, não pasteurizados e informais. A análise dos fatores de risco foi realizada no programa Epi info 3.5.4, pelo teste do qui-quadrado, com IC de 95% e $p < 0,1$. Para a população estudada, o consumo de leite informal pode ser considerado um fator de risco para MAP em amostras de biópsias intestinais. Isso seria esperado, visto que a bactéria é eliminada por animais doentes principalmente pelas fezes e leite. A caracterização da população sugere alguns possíveis fatores de risco, como a realização de tratamento cirúrgico e

histórico familiar de agravos intestinais, que podem ser confirmados a partir de um estudo com um número maior de casos.

Palavras chave: PCR, questionário, paratuberculose, leite, Doença de Crohn

1-Introdução

Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP) é um bacilo Gram positivo, agente etiológico da doença inflamatória intestinal crônica granulomatosa denominada paratuberculose ou Doença de Johne. A paratuberculose é uma enfermidade com curso geralmente subclínico, podendo evoluir para a forma clínica em animais adultos, podendo acometer todos ruminantes e pseudoruminantes domésticos e silvestres. (Chiodini et al., 1984; Sweeney, 1996).

Essa bactéria tem sido isolada de pacientes com doenças inflamatórias intestinais (DII) como pacientes portadores de Doença de Crohn (DC) e com menos frequência em pacientes com Retocolite ulcerativa (RCU). A DC é uma doença inflamatória intestinal de etiologia desconhecida, que se caracteriza por inflamação crônica, focal, assimétrica transmural e granulomatosa, e pode afetar qualquer segmento do tubo digestivo, da boca ao ânus, embora com preferência pela porção distal do intestino delgado e intestino grosso proximal (Sands, 2006).

O frequente isolamento de MAP de amostras intestinais de pacientes com DII e a semelhança clínica, histológicas e radiológicas entre a paratuberculose e a DC levantam a preocupação sobre o potencial zoonótico de MAP.(Prantera *et al.*, 1989; Nacy et al, 2008; Fiocchi, 2012). Com a modernização das técnicas moleculares, DNA de MAP vem sendo detectado em fragmentos de tecido obtidos de portadores da DC em números cada vez maiores, eventualmente sendo identificado em pacientes portadores de DII e outras doenças não inflamatórias intestinais (Naser et al., 2000; Carvalho et al-prelo).

Apesar do potencial não esclarecido, e as dificuldades de se realizar trabalhos que comprovem o mesmo, a preocupação com a exposição das populações ao agente é crescente. Isso ocorre principalmente devido as características do agente que é eliminado em fezes e leite de animais doentes,

o que pode contaminar alimentos e cursos d'água, chegando às comunidades. Foi demonstrado que MAP resiste às altas temperaturas podendo ser encontrado viável em produtos lácteos pasteurizados e em água para consumo humano. O tratamento térmico desses produtos lácteos é capaz de diminuir a carga bacteriana, porém nem sempre elimina-la. O mesmo ocorre com relação ao tratamento de água para consumo e de efluentes. (Mishina et., al 1996; Sung e Collins, 1998;. Whan et., al 2001. Beumer et., al 2010; Carvalho et al 2012 Fiocchi, 2012)

2-Objetivo

Verificar fatores de risco para a presença de MAP em amostras de biópsias intestinais humanas, de pacientes com DC, RCU e pacientes não portadores de DII.

2-Materias e métodos

2.1- Delineamento do estudo

Foi realizado estudo caso-controle com objetivo de identificar possível associação entre a variável desfecho (dependente) presença de MAP em amostras de biópsias intestinais humanas e variáveis independentes (exposições) de ordem sanitária, socioeconômica, entre outras.

A amostragem realizada foi de conveniência em virtude da necessidade dos resultados de um estudo anterior (Carvalho et al- prelo). A população de origem dos casos e controles foi a população de pacientes atendidos no Instituto Alpha de Gastreenterologia situado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), dentre aqueles que realizaram o exame de colonoscopia entre os anos de 2009 e 2011, quando as biópsias foram coletadas dos casos e controles. O Instituto é considerado centro de referência na especialidade e, por essa razão atende pacientes de diversas regiões do Estado de Minas Gerais.

Esse estudo é continuação de um trabalho onde foram coletadas amostras de biópsias (24 frescas e 148 parafinadas) intestinais de 172 pacientes, submetidos à colonoscopia sob diversas indicações. Nesse estudo foram incluídos 148 desses pacientes, sendo as perdas devido a falecimento

ou registro incompleto dos pacientes, impossibilitando o contato com os mesmos. Desses, 57 amostras de pacientes eram de portadores de DC, 38 com RCU e 53 com outras indicações de colonoscopia.

Foram denominados casos, os oito pacientes cujas amostras de biópsias intestinais continham DNA de MAP, detectado pela técnica da Reação de Polimerase em Cadeia. Sendo os demais indivíduos amostrados no estudo prévio, considerados controles, independente do diagnóstico recebido para o problema intestinal. A proporção de casos e controles foi de 17,5 controles para cada

Os dados do indivíduo e outras informações puderam ser acessados nas fichas dos pacientes através do Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME).

O Contato com os pacientes se deu durante a própria visita ao Ambulatório de intestino do HC-UFMG ou através do telefone.

2.3- Coleta de dados

A aplicação de questionário estruturado (Anexo I) foi o instrumento de coleta de dados utilizado para identificação da condição ("status") dos casos e controles participantes em relação às variáveis de exposição analisadas no estudo.

A maioria das questões do questionário era do tipo fechada e/ou mista (contém alternativas de resposta pré-estabelecidas, mas admitem respostas não-previstas para algumas alternativas de respostas, por exemplo, "Outros", medicamentos, etc).

Esse questionário pesquisou questões sobre a doença, tratamentos realizados, sintomas e intervenções anteriores, além de características socioeconômicas, presença de agravos intestinais entre os familiares, para verificação de variáveis associadas à presença do micro-organismo e o histórico familiar dos agravos. Também foram verificadas condições de saneamento e higiene desfavoráveis, consumo de leite e derivados pasteurizados, não pasteurizados e informais.

Os resultados dos questionários foram associados aos resultados dos testes laboratoriais previamente descritos permitindo a detecção dos fatores relacionados à presença de MAP nas amostras intestinais. O questionário também permitiu a elaboração do perfil dos pacientes quanto as características do indivíduo.

O termo de consentimento livre e esclarecido foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal de Minas gerais sob o parecer (ETIC nº 0471.0.203.000-10) e assinado pelos pacientes como pré-requisito para a participação no estudo.

A aplicação do questionário foi realizada por apenas um entrevistador, que no momento da entrevista não conhecia o “status” (caso ou controle) do paciente quanto a detecção de MAP, reduzindo a possibilidade de inserção de viés do entrevistador. Todas as questões foram indagadas acerca do período anterior ao momento da realização as biópsias. Apesar de minimizado o viés do entrevistador, os resultados da pesquisa estão sujeitos ao viés de memória, já que os indivíduos são questionados a um período anterior de sua vida.

2.4- Análise estatística

A análise dos dados do estudo caso-controle foi iniciada com a construção de banco de dados no programa Epi Info™ versão 3.5.3 (CDC, 2011). A primeira etapa da construção do banco de dados compreendeu a elaboração da máscara/espelho do banco de dados. Posteriormente, foi realizada à construção do banco de dados propriamente dita, com a inserção das respostas de cada questionário no programa, cuidadosamente, conferidas após cada inserção

A seguir, utilizando-se esse banco de dados consolidado, foi realizada análise univariada, que possibilitou avaliar o perfil da distribuição de cada variável para casos e controles, resultando em tabelas de frequência simples.

A próxima etapa consistiu na análise bivariada das variáveis, na qual avaliou-se a relação entre a variável dependente ocorrência de MAP na biópsia e as variáveis independentes socioeconômicas, ingestão de produtos lácteos e sanitárias/ambientais, entre outras.

A intensidade da associação entre a variável dependente e independente foi calculada através da medida de associação razão de chances, e seu respectivo intervalo de confiança (IC) a 95% de probabilidade. razão de chances (RC) e os IC (95%) foram interpretados considerando-se : valor da RC igual 1 ou IC (95%) incluindo o valor 1 = não associação entre a variável independente e MAP; valor da RC superior a 1 e IC (95%) não incluindo o valor 1 = variável independente apresenta-se como fator de risco para presença de MAP; valor da RC inferior a 1 e IC (95%) não incluindo o valor 1 = variável independente apresenta-se como fator de proteção para presença de MAP.

Para testar a hipótese de associação entre as variáveis independentes e a ocorrência de MAP em biópsias, foi realizado o teste de do qui-quadrado, considerando α igual a 5%.

Para a realização da análise dos possíveis fatores de risco para MAP em amostras de intestino humano foram consideradas as variáveis investigadas no questionário e a elas foram atribuídas as categorias exposto e não exposto, como descrito na tabela 1

Tabela 1- Categorias atribuídas às variáveis pesquisadas para a análise bivariada.

Variáveis/categorias	Exposto	Não exposto
Município de residência	<ul style="list-style-type: none"> • Região metropolitana de Belo horizonte • Fora da capital 	<ul style="list-style-type: none"> • Belo Horizonte
Ocupação	<ul style="list-style-type: none"> • Agrupamento 5 • Agrupamento 6 	<ul style="list-style-type: none"> • Agrupamento 1 • Agrupamento 2 • Agrupamento 3 • Agrupamento 4
Beneficiário de programa de benefício social	<ul style="list-style-type: none"> • Sim 	<ul style="list-style-type: none"> • Não
Renda familiar	<ul style="list-style-type: none"> • Até 1 salário mínimo • 1 à 3 salários mínimos 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 a 5 salários mínimos • 5 a 10 salários mínimos • Acima de 10 salários mínimos
Número de dependentes da renda	<ul style="list-style-type: none"> • 3 • 4 • 5 • Acima de 51 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 • 2

Escolaridade	<ul style="list-style-type: none"> • Analfabeto • Ensino fundamental incompleto • Ensino fundamental completo • Ensino médio incompleto 	<ul style="list-style-type: none"> • Ensino médio completo • Ensino superior incompleto • Ensino superior completo • Pós-graduado
Casa própria	<ul style="list-style-type: none"> • Não 	<ul style="list-style-type: none"> • Sim
Zona de residência:	<ul style="list-style-type: none"> • Rural 	<ul style="list-style-type: none"> • Urbana
Fonte da água para consumo:	<ul style="list-style-type: none"> • Poço raso • Poço semi-artesiano • Nascente 	<ul style="list-style-type: none"> • Abastecimento público
Realiza tratamento da água para consumo	<ul style="list-style-type: none"> • Não 	<ul style="list-style-type: none"> • Sim
Destino do esgoto sanitário	<ul style="list-style-type: none"> • Fossa séptica • Céu aberto ou rio 	<ul style="list-style-type: none"> • Rede de Esgoto da cidade
Fumante	<ul style="list-style-type: none"> • Sim, até 20 cigarros por dia • Sim, acima de 20 cigarros por dia 	<ul style="list-style-type: none"> • Não sou fumante
Qual o diagnóstico	<ul style="list-style-type: none"> • Crohn • Retocolite Ulcerativa 	<ul style="list-style-type: none"> • Outras doenças e pacientes normais
A quem recorre quando apresenta algum problema intestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Toma remédios por conta própria • Terapias alternativas • Ao médico e/ou toma remédios por conta própria • Toma remédios por conta própria e usa terapias alternativas • Ao médico, toma remédios por conta própria e usa terapias alternativas 	<ul style="list-style-type: none"> • Ao médico
Frequência de consumo de leite e derivados	<ul style="list-style-type: none"> • Mais de uma vez ao dia • Diariamente • Três vezes por semana • Uma vez por semana 	<ul style="list-style-type: none"> • Quinzenalmente • Raramente • Não consome
Produtos mais consumidos	<ul style="list-style-type: none"> • Leite informal, derivados informais e derivados não pasteurizados (queijo canastra e do serro) • Ambos 	<ul style="list-style-type: none"> • Leite UAT, pasteurizado, em pó e/ou derivados pasteurizados (queijos, iogurtes) • Não consome
Consumo do leite informal	<ul style="list-style-type: none"> • Consome cru 	<ul style="list-style-type: none"> • Consome fervidos • Não consome
Possui histórico de agravos intestinais na família	<ul style="list-style-type: none"> • Sim 	<ul style="list-style-type: none"> • Não
Diagnóstico obtido	<ul style="list-style-type: none"> • Crohn • Retocolite Ulcerativa 	<ul style="list-style-type: none"> • Outras doenças

3-Resultados e Discussão

3.1- Análise univariada

Os resultados da análise univariada dos questionários aplicado participantes do estudo caso-controle realizado no HC-UFMG, estão apresentados nas tabelas 2 à 6.

Tabela 2- Distribuição de dados do indivíduo e socioeconômicos segundo a detecção de MAP em biópsias intestinais através da técnica de PCR

Variáveis	Total de observações (n=148)	Casos (%) n=8	Controles (%) n=140
Idade			
• Até 18 anos	3 (2,0)	0 (0,0)	3 (2,2)
• De 19 a 24 anos	13 (8,8)	0 (0,0)	13 (9,4)
• De 25 a 45 anos	65 (43,9)	5 (62,5)	60 (43,2)
• De 46 a 60 anos	42 (28,3)	2 (25,0)	40 (28,8)
• Acima de 60 anos	24 (16,2)	1 (12,5)	23 (16,5)
• Não informado	1 (0,67)	0 (0,0)	1 (0,7)
Município de residência			
• Belo Horizonte	66 (44,6)	4 (50)	61 (43,6)
• Região metropolitana de Belo horizonte	39 (26,3)	4 (50)	35 (25,0)
• Fora da capital	44 (29,7)	0 (0,0)	44 (31,4)
• Não informado	0 (0,0)	0(0,0)	0(0,0)
Ocupação*			
• Agrupamento 1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
• Agrupamento 2	7(4,7)	1(12,5)	6 (4,3)
• Agrupamento 3	11 (7,4)	1(12,5)	10(7,2)
• Agrupamento 4	54 (36,4)	1(12,5)	53 (38,6)
• Agrupamento 5	32 (21,6)	2 (25)	30 (21,6)
• Agrupamento 6	40 (27)	3 (37,5)	37 (26,6)
• Não informado	4 (2,7)	0 (0,0.)	3 (2,1)
Beneficiário de programa de benefício social			
• Não	133(89,9)	6 (75,0)	127 (90,7)
• Sim	15 (10,1)	2 (25,0)	13 (9,3)
• Não informado	0 (0,0)	0 (0,0)	0(0,0)
Renda familiar			
• Até 1 salário mínimo	24 (16,2)	3 (37,5)	21 (15,0)
• 1 à 3 salários mínimos	69 (46,6)	0 (0,0)	69 (49,3)
• 3 a 5 salários mínimos	34 (22,9)	3 (37,5)	31 (22,1)
• 5 a 10 salários mínimos	12 (8,1)	2 (25,0)	10 (7,1)
• Acima de 10 salários mínimos	4 (2,7)	0 (0,0)	4(2,9)
• Não informado	5 (3,3)	0 (0,0)	5 (3,6)
Número de dependentes da renda			
• 1	35 (23,6)	2 (25,0)	33 (23,6)
• 2	21 (14,2)	2 (25,0)	19 (13,6)
• 3	51 (34,4)	3 (37,5)	48 (34,3)
• 4	24 (16,2)	1 (12,5)	23 (16,4)

• 5	13 (8,8)	0 (0,0)	13 (9,3)
• Acima de 5	1 (0,67)	0 (0,0)	1 (0,7)
• Não informado	3 (2,0)	0 (0,0)	3 (2,1)
Escolaridade			
• Analfabeto	2 (1,35)	0 (0,0)	2 (1,4)
• Ensino fundamental incompleto	32 (21,6)	2 (25,0)	35 (25,0)
• Ensino fundamental completo	36 (24,3)	1 (12,5)	30 (21,4)
• Ensino médio incompleto			
• Ensino médio completo	4 (2,7)	0 (0,0)	4 (2,9)
• Ensino superior incompleto			
• Ensino superior completo	43 (29,05)	3 (37,5)	40 (28,6)
• Pós-graduado			
• Não informado	7 (4,7)	1 (12,5)	7 (5,0)
	21 (14,1)	0 (0,0)	20 (14,3)
	3 (2,0)	1 (12,5)	2 (1,4)
	0 (0,0)	0(0,0)	0 (0,0)
Reside em casa própria			
• Sim	101 (68,2)	7 (87,5)	94 (67,1)
• Não	47 (31,7)	1 (12,5)	46 (32,9)
• Não informado	0 (0,0)	0(0,0)	0(0,0)
Zona de residência:			
• Rural	24 (16,2)	3 (37,5)	21 (15,0)
• Urbana	124 (83,7)	5 (62,5)	119 (85,0)
• Não informado	0 (0,0)	0(0,0)	0(0,0)

*As ocupações consideradas em cada grupo (1 à 6) constam no anexo III

Os dados do indivíduo e variáveis socioeconômicas dispostas na tabela 2 permitem algumas inferências sobre a população estudada. A maioria dos indivíduos participantes do estudo possui entre 25 e 45 anos, seguido pela faixa etária de 45 a 60 anos. Essa concentração já é esperada, pois, principalmente para os portadores de DII que incluem indivíduos com DC e RCU, que são doenças que são diagnosticadas em pessoas mais jovens. Outro fator que contribui para a maior concentração de indivíduos nessa faixa etária é que essa é a idade das pessoas geralmente consideradas parte da população economicamente ativa. Essa distribuição segue quando analisadas a população de indivíduos positivos e negativos para MAP

Quando verificada a distribuição das ocupações dos participantes (anexo III), verifica-se que a maior parte desses encontra-se concentrada nos agrupamentos de ocupações de número 4 que incluem profissionais com o mínimo de aprendizado profissional, geralmente com ensino fundamental ou médio, e 6 que inclui donas de casa e estudantes. Quando observadas separadamente, percebe-se que a distribuição se modifica entra a população

de positivos, onde 37,5% dos indivíduos possui ocupações relacionadas ao agrupamento 4, e 25,0% com o grupo 5, que inclui profissionais como empregadas domésticas e pequenos proprietários rurais.

Dentre os 148 participantes, 133 não participam de nenhum programa de benefício social, o que corresponde a 25% dos casos e 90,7% dos controles.

Diante das duas últimas variáveis descritas, percebe-se que entre a população de casos há pessoas com ocupações que exigem menor nível de ensino e maior percentagem de indivíduos que participam de programas de benefício social.

Com relação à renda familiar dos indivíduos, 46,6% dos participantes tem renda entre 1 e 3 salários mínimos. Entre a população de negativos essa concentração se mantém, porém entre os indivíduos positivos 37,5% recebe até um salário mínimo e outro 37,5% recebe entre 3 e 5 salários. Ainda com relação à renda, os dependentes da renda eram três, em 34,5% da população total estudada, para 14,2% havia dois dependentes e em 23% apenas um indivíduo era dependente da renda. Distribuição semelhante pode ser verificada para a população de casos, porém, para a população de negativos 23,6% era de apenas um dependente, 13,6% de dois dependentes e de 34,3%, e de quatro indivíduos tinha-se um total de 16,4%. Não havia indivíduos com mais de quatro dependentes da renda entre os positivos, porém entre os negativos haviam indivíduos que alegaram um número de dependentes de cinco ou mais pessoas. Isso demonstra que os núcleos familiares dos indivíduos é geralmente menor entre os indivíduos positivos.

Verificando o grau de escolaridade da população verifica-se que 79,1% da população tem até o ensino médio, quando verificada a população de positivos, esse número diminui para 75% e entre os negativos corresponde a 79,3%, demonstrando uma pequena diferença.

Com relação à possuir casa própria, 68,2% dos participantes possuem casa própria, porém 87,5% dos indivíduos positivos não possuem, enquanto apenas 32,9% dos negativos não moram em casa própria. Indivíduos que não possuem casa própria tem maior probabilidade de mudar-se, expondo a uma maior diversidade de agentes patogênicos ou não, assim como usufruir de

novas fontes de abastecimento de água e esgoto, que podem ser fonte de contaminação de MAP. Ainda com relação à moradia, 83,8% da população total reside ou residiu a maior parte de sua vida na região urbana. Apesar disso, a percentagem de moradores da zona rural é maior entre os casos (37,5%) do que entre os controles (15%). Moradores da zona rural em geral não possuem abastecimento de água tratada e destinação adequada dos efluentes, além de possuírem maior possibilidade de ingerir alimentos não pasteurizados e não inspecionados, aumentando a possibilidade de entrarem em contato com agentes microbianos como MAP.

Em seguida serão demonstradas as variáveis relacionadas a saneamento.

Tabela 3-Distribuição das variáveis relacionadas a saneamento, segundo a detecção de MAP em biópsias intestinais através da técnica de PCR

Variáveis	Total de observações (n=148)	Positivas (%) n=8	Negativas (%) n=140
Fonte da água para consumo:			
• Abastecimento público	118 (79,7)	5 (62,5)	113 (80,7)
• Poço raso	16 (10,8)	1 (12,5)	15 (10,7)
• Poço semi-artesiano	2 (1,3)	0 (0,0)	2 (1,4)
• Nascente	12 (8,1)	2 (25,0)	10 (7,1)
• Não informado	0 (0,0)	0(0,0)	0(0,0)
Realiza tratamento da água para consumo:			
• Sim	139 (93,9)	8 (100)	131 (93,6)
• Não	9 (6,0)	0(0,0)	9 (6,4)
• Não informado	0 (0,0)	0(0,0)	0(0,0)
•			
Destino do esgoto sanitário			
• Rede de Esgoto da cidade			
• Fossa séptica	120 (81)	5 (62,5)	115 (82,7)
• Céu aberto ou rio	23(15,5)	3 (37,5)	20 (14,4)
• Não informado	4 (2,7)	0 (0,0)	4 (2,9)
	1 (0,67)	0 (0,0)	1 (0,7)

Cerca de 80% da população possui abastecimento público com água tratada na sua residência, sendo que os demais fazem uso de poço raso ou semi artesiano (12,1%) ou nascente (8%). Já entre a população de positivos o uso de água de nascentes é mais frequente (25%), assim como o uso de poço (12,5%). De forma geral o uso de água de nascentes ou poços indica maior

possibilidade de entrar em contato com agentes patogênicos, como MAP, pois não ocorre o tratamento da água

Como descrito na Tabela 3, 94% da população realiza a filtragem ou purificação da água de consumo em sua residência, sendo que todos os indivíduos que não realizavam esse tratamento eram da população de controles

Ainda sobre variáveis relacionadas ao saneamento, 81% da população possui acesso a rede de esgoto municipal, 15,5% fazem o uso de fossa séptica, e 2,7% tinham seu esgoto direcionado a um rio ou disposto a céu aberto. O uso de fossa séptica foi mais frequente entre casos (37,5) do que entre controles (14,4%). O uso de fossa séptica, se não confeccionada de forma correta pode representar risco a saúde dos usuários, expondo-os a diversos patógenos, em decorrência de vazamentos e contaminação do solo e de fontes de água.

Tabela 4- Distribuição de variáveis relacionadas à saúde e agravos intestinais segundo a detecção de MAP em biópsias intestinais através da técnica de PCR

Variáveis	Total de observações (%) (n=148)	Casos (%) n=8	Controles (%) n=140
Fumante			
• Sim, até 20 cigarros por dia	45 (30,5)	5 (62,5)	40 (28,6)
• Sim, acima de 20 cigarros por dia			
• Não sou fumante	6 (4,0)	0 (0,0)	6 (4,3)
• Não informado	97 (65,5)	3 (37,5)	94 (67,1)
	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Sintomas do aparelho digestório			
• Fístula	5 (3,3)	0 (0,0)	5 (3,6)
• Diarreia	31 (21)	2(25,0)	29 (20,9)
• Dor abdominal	14 (9,4)	1 (12,5)	13 (9,4)
• Diarreia e emagrecimento	7 (4,7)	1 (12,5)	6 (4,3)
• Diarreia e dor abdominal	42 (28,3)	2(25,0)	40 (28,8)
• Dor abdominal e febre	4 (2,7)	0 (0,0)	4 (2,9)
• Diarreia, emagrecimento e febre.			
• Diarreia, febre, dor abdominal, fístula e emagrecimento.	18 (12,6)	0(0,0)	18 (12,9)
• Não apresentou	11 (7,4)	2(25,0)	9 (6,5)
• Não informado	7 (4,7)	0 (0,0)	7 (5,0)
	1 (0,6)	0 (0,0)	1 (0,7)
Há quanto tempo se iniciaram os sintomas (com relação a coleta da biópsia)			
• Até 2 anos atrás	5 (3,3)	1 (12,5)	4 (2,9)
• De 2 a 5 anos atrás	64 (43,2)	1 (12,5)	63 (45,3)
• De 2 a 5 anos atrás	41 (27,7)	3 (37,5)	38 (27,3)

• De 5 a 10anos atrás	34 (23)	3 (37,5)	31 (22,3)
• Há mais de 10 anos	1 (0,6)	0 (0,0)	4 (2,9)
• Não informado			
Qual o diagnóstico			
• Crohn	57 (38,5)	2 (25,0)	55 (39,9)
• Retocolite Ulcerativa	38 (25,6)	3 (37,5%)	35 (25,4)
• Outras doenças e pacientes normais	51 (34,5)	3 (37,5)	47 (32,9)
• Não informado	2 (1,3)	0 (0,0)	2 (1,4)
Foi realizado tratamento clínico			
• Sim	102 (69)	7 (87,5)	95 (68,3)
• Não	43 (29,05)	1 (12,5)	42 (30,2)
• Não informado	3 (2,02)	0 (0,0)	3 (2,1)
Qual a medicação usada			
• Infiximab	17 (11,4)	0 (0,0)	17 (12,2)
• Sulfassalazina e azatioprina	15 (10,1)	0 (0,0)	15 (10,8)
• Azatioprina e mesalazina	14 (9,4)	0 (0,0)	14 (10,1)
• Azatioprina, mesalazina e omeprazol	3 (2,2)	0 (0,0)	3 (2,1)
• Azatioprina, mesalazina e prednisona	39 (26,35)	3 (37,5)	36 (25,9)
• Não informado ou não realizou tratamento clínico	60 (40,5)	5 (62,5)	55 (38,5)
Tratamento cirúrgico			
• Sim	46 (31,08)	7 (87,5)	45 (32,4)
• Não	101 (68,2)	1 (12,5)	94 (67,6)
• Não informado	1 (0,6)	0(0, 0)	1 (0,7)
Extensão no aparelho digestório			
• TGI superior	9 (6,1)	1 (12,5)	8 (5,8)
• Íleo terminal	13 (8,7)	0 (0,0)	13(9,4)
• Ileocólon	26 (17,5)	3 (37,5)	22(15,8)
• Ileocolón e perianal	19 (12,8)	0 (0,0)	19 (13,7)
• Perianal	9 (6,1)	0 (0,0)	9 (6,5)
• Não informado	28 (18,9)	1 (12,5)	27 (19,4)
Local do tratamento			
• Hospital das clínicas da UFMG			
• Outro	111 (75)	6 (75,0)	105(75,5)
• Não informado ou não realizou tratamento	33 (22,3)	2 (25,0)	31 (22,3)
	4 (2,7)	0 (0,0)	3 (2,2)
A quem recorre quando apresenta algum problema intestinal			
• Ao médico	89 (60,1)	6 (75,0)	83 (59,7)
• Toma remédios por conta própria	4 (2,7)	0 (0,0)	4(2,9)
• Terapias alternativas			
• Ao médico e/ou toma remédios por conta própria	1 (0,6)	0 (0,0)	1 (0,7)
• Toma remédios por conta própria e usa terapias alternativas	34 (22,3)	2 (25)	32 (23,0)
• Ao médico, toma remédios por conta própria e usa terapias alternativas	10 (6,75)	0 (0,0)	10 (6,75)
• Não informado	9 (6,08)	1 (12,5)	8 (5,8)
	2 (1,3)	0 (0,0)	2 (1,4)

De acordo com a tabela 4, 65,5% da população estudada não é e nunca foram fumantes, 35,5% fuma ou já fumou até 20 cigarros por dia e 4% fuma ou já fumou mais que 20 cigarros por dia. Já entre a população de positivos, a percentagem de indivíduos que fumam até 20 cigarros por dia é maior (62,5%) e entre controles o valor é de 28,6%, sendo que apenas 37,5% dos casos eram compostos por indivíduos não fumantes e o mesmo ocorre para 67,1% dos controles, sendo que ainda entre os controles 4,1% fumava mais de 20 cigarros por dia. Isso quer dizer que entre os controles há uma proporção maior de indivíduos não fumantes, porém há também indivíduos que fumam uma quantidade maior de cigarros. É conhecido que o tabagismo está associado a ocorrência de doenças intestinais inflamatórias, sendo um fator de risco para doença de Crohn, e atuando como um fator de proteção para portadores de Retocolite Ulcerativa, sendo que esses indivíduos com RCU possuem um risco maior de desenvolver a doença caso param de fumar (Fiocchi 2012). Apesar de não se saber qual a participação de MAP no aparecimento desses quadros, pode-se inferir que fatores de risco ocorrendo de forma concomitante podem aumentar a possibilidade de desenvolver o quadro ou mesmo agravar o quadro instalado.

Quanto aos sintomas relacionados ao aparelho digestório demonstrados, tem-se a diarreia como o sintoma mais frequente, não estando presentes entre apenas 27 (18,2%) do total de participantes do estudo. De forma geral os indivíduos apresentavam diarreia associado a outro sintoma como emagrecimento ou dor abdominal.

Com relação ao tempo decorrido desde o início dos sintomas 3,3% dos participantes apresentaram os sintomas mais recentemente, até dois anos antes do início da pesquisa, outros 43,2% apresentaram os sintomas de dois à cinco anos antes e outros 27,7 apresentaram os sintomas de cinco a 10 anos e 23% iniciaram os sintomas há mais de 10 anos. Entre os casos 75% iniciaram os sintomas mais de cinco anos antes da biópsia utilizada no estudo, já entre os controles apenas 49,6% deram essa resposta.

Como esperado, já que o instituto Alpha é considerado um centro de referência para Doenças Intestinais Inflamatórias (DII), o diagnóstico recebido

pelos participantes sobre o problema intestinal foi principalmente de DC 38,5 seguido dos não portadores de DII (34,5%) e de portadores de Retocolite Ulcerativa (RCU) (25,6%). Entre os casos o diagnóstico mais frequente foi de RCU (37,5%) e de não portadores de DII (37,5%), sendo a DC diagnosticada para apenas 25% dos indivíduos. Essa distribuição é diferente para os controles onde 39,9% teve diagnóstico de DC, enquanto 25,4% foram considerados portadores de RCU e 32,9% não tinha DII, situação esperada, diante do frequente isolamento do agente entre pacientes com DC, previamente discutido. Desses, 69% realizou tratamento clínico e 46% realizou tratamento cirúrgico. Comparando-se controles e casos tem-se que o tratamento clínico foi realizado por 87,5% dos casos e 68,3% dos controles. Já com relação ao tratamento cirúrgico, apenas 12,5 % dos casos não realizou o procedimento, enquanto 67,6% dos controles não realizaram, sendo que 75% dos pacientes realizou o tratamento no HC-UFMG, tanto entre casos quanto entre controles. O procedimento cirúrgico também pode ser responsável pela contaminação dos tecidos dos casos, já que expõe o aparelho digestório do indivíduo ao ambiente potencialmente contaminado, além disso, o próprio cirurgião e equipamentos podem veicular a contaminação bacteriana, principalmente de agentes conhecidamente resistentes a processos de eliminação de patógenos, como a pasteurização e cloração. (Whan et., al 2001; Carvalho et al, 2012).

Ainda com relação aos agravos intestinais a extensão das lesões entre a população total foi predominantemente na região do ileocólon (17,5%), sendo que a distribuição é semelhante entre casos e controles.

Sobre a postura diante do aparecimento de sintomas intestinais, 60% dos participantes alegaram procurar um médico e outros 22,3% disseram procurar um médico e/ou fazer o uso de medicações por conta própria, outros 0,6% praticam o uso de terapias alternativas, e 6,08% realizam as três práticas e 2,7% apenas toma medicações por conta própria. Entre casos a maioria (75%) continua sendo de indivíduos que procuram o médico com o aparecimento de algum sintoma ou desconforto intestinal, o mesmo ocorre entre os controles (59,7%). Pessoas que realizam apenas a automedicação

incluem apenas os controles, assim como os que realizam o uso de terapias alternativas e aqueles que fazem uso de terapias alternativas e automedicação. A automedicação é uma prática desaconselhada, principalmente no caso de pacientes com infecções bacterianas, o que pode ser o caso dos pacientes onde se detectou MAP, apesar de ainda não ser conhecida a patogênese do mesmo no intestino humano. A prática de consumo de medicamentos não prescritos, como antimicrobianos pode causar o agravo dos quadros, uma vez que a administração inadequada pode levar a resistência bacteriana. (Berquó et al., 2004)

Apesar disso, para MAP a eliminação por antimicrobianos só pode ser feita através de prescrição de medicação bastante específica, não sendo feita por drogas costumeiramente utilizadas. Dessa forma a administração de antimicrobianos de forma indiscriminada irá eliminar outras populações bacterianas, permitindo que MAP se sobreponha a essa e seja detectado em amostras teciduais, por exemplo.

Tabela 5- Distribuição das variáveis relacionadas ao consumo de produtos lácteos segundo a detecção de MAP em biópsias intestinais através da técnica de PCR

Variáveis	Total de observações (n=148)	Casos (%) n=8	Controles (%) n=140
Frequência de consumo de leite e derivados			
• Mais de uma vez ao dia	29 (19,6)	5 (62,5)	24 (17,3)
• Diariamente	44 (29,7)	3(37,5)	41(29,5)
• Três vezes por semana	27 (18,25)	0 (0,0)	27 (19,4)
• Uma vez por semana	13 (8,8)	0 (0,0)	13 (9,4)
• Quinzenalmente	5 (3,3)	0 (0,0)	5 (3,6)
• Raramente	25 (16,9)	0 (0,0)	25(18)
• Não consome	4 (2,7)	0 (0,0)	4 (2,9)
• Não informado	1 (0,6)	0 (0,0)	1 (0,7)
Produtos mais consumidos			
• Leite UAT, pasteurizado, em pó e/ou derivados pasteurizados (queijos, iogurtes)	65 (43,9)	1 (12,5)	64 (46,0)
• Leite informal, derivados informais e derivados não pasteurizados (queijo canastra e do serro)	1 (0,6)	0 (0,0)	1 (0,7)
• Ambos	67 (45,2)	7 (87,5)	70 (50,4)
• Não consome	4 (2,7)	0 (0,0)	4 (2,9)
• Não informado	1 (0,6)	0(0,0)	1 (0,7)
Consumo do leite informal			
• Consome cru	17 (11,5)	5 (62,5)	12 (10,8)
• Consome fervidos	38 (25,6)	2 (25)	36(25,7)
• Não consome	90 (60,8)	1(12,5)	88 (63,3)

• Não informado	3 (2,02)	0 (0,0)	3 (2,1)
Localidade de compra esses produtos			
• Supermercado	66 (44,5)	1 (12,5)	65 (46,8)
• Padaria	9 (6,08)	1 (12,5)	8 (5,8)
• Mercadinhos de bairro	7 (4,7)	1 (12,5)	6(4,3)
• Supermercado e padaria	41 (27,7)	2 (25,0)	39 (28,1)
• Supermercado e ambulantes ou fazendas	21 (14,2)	3 (37,5)	18 (12,9)
• Não informado			
	1 (0,6)	0 (0,0)	1 (0,7)

A partir dos dados disponíveis na tabela 5 podem-se conhecer os hábitos dos pacientes pesquisados com relação ao consumo de produtos lácteos, que são de interesse para o estudo, uma vez que os bovinos portadores da paratuberculose eliminam o agente também através do leite. Dessa forma, verifica-se que 76,4% da população total consomem produtos lácteos ao menos uma vez por semana, o que corresponde a 100% dos controles e 75% dos casos. A maior frequência de consumo desses produtos reforça a possibilidade de contaminação desses indivíduos através do consumo desses produtos.

Quanto aos produtos lácteos consumidos, 45,2% dos indivíduos participantes do estudo disseram consumir tanto produtos pasteurizados quanto produtos informais ou não pasteurizados, enquanto 43,9% consumiam apenas produtos pasteurizados. Comparando-se casos e controles, a proporção muda sendo que 87,5% dos casos consomem produtos pasteurizados e não pasteurizados, enquanto isso ocorre para apenas 50,4% dos controles. Essa é outra variável possivelmente associada com a contaminação dos indivíduos com MAP através do consumo de produtos lácteos, principalmente aqueles não pasteurizados, uma vez que se sabe que a pasteurização pode não ser capaz de remover cargas bacterianas mais altas do agente, podendo o mesmo ser detectado em leite pasteurizado e produtos como queijo coalho (Grant et al, 2002 Carvalho et al, 2012; Faria et al 2014)

Ainda sobre o consumo de produtos informais, os participantes foram questionados sobre o processamento ou não dos produtos consumidos, sendo que 60,8% responderam que não consumiam esses produtos, 11,5% disseram consumir cru, e 25,6 consumiam fervido. O consumo de produtos lácteos informais, principalmente leite cru, aumenta a possibilidade do indivíduo de se

contaminar com MAP. Visto que entre os casos a proporção de indivíduos que consumiam o produto cru, é de 62,5% e entre os controles é de 10,8%, nota-se que a probabilidade dos indivíduos ter entrado em contato com MAP através do consumo de leite cru, como descrito por Carvalho et al (2012), que identificaram o agente de forma viável em leite pasteurizado.

Os participantes também foram questionados quanto ao local de compra dos produtos lácteos, já que a venda em estabelecimentos menores ou a partir de vendedores ambulantes e diretamente de fazendas geralmente está associada ao maior risco de comércio de produtos não inspecionados, aumentando a probabilidade desses estarem contaminados com patógenos, obteve-se que 44,5% dos participantes adquiriam seus produtos no supermercado, o que corresponde à 12,5% dos casos e 46,8% dos controles. Outros 6,08% compravam os produtos em padarias, sendo esses 12,5% dos casos e 5,8% dos controles. Outros 4,7% compravam principalmente produtos lácteos em mercadinhos de bairro, sendo esses 12,5% dos casos e 4,3% dos controles. Já a compra em supermercados e padarias era realizada por 27,7% dos indivíduos, ou 25% dos casos e 28,1% dos controles. Outros 14,1% compravam os produtos tanto em supermercados como diretamente de ambulantes ou fazendas, sendo esses 37,5% dos casos e 12,9 dos controles. Como esperado, nota-se que a compra em estabelecimentos de pequeno porte ou vendedores informais, é mais comum entre os pacientes positivos para MAP em suas biópsias, o que indica que o consumo de produtos lácteos informais deve estar associado a detecção de MAP em intestino humano.

Tabela 6-Distribuição de variáveis relacionadas a histórico familiar de agravos intestinais segundo a detecção de MAP em biópsias intestinais através da técnica de PCR

Variáveis	Total de observações (n=148)	Casos (%) n=8	Controles (%) n=140
Possui histórico de agravos intestinais na família			
• Sim	38 (25,6)	2 (25,0)	36 (25,9)
• Não	107 (72,2)	6 (75,0)	101(72,7)
• Não informado	3 (2,02)	0 (0,0)	3 (2,1)
Grau de parentesco			
• Pai, mãe, filho ou filha	6 (4,0)	0 (0,0)	6 (6,5)
• Irmão, irmã, avô ou avó	12 (8,1)	0 (0,0)	12 (46,8)

• Tio, Tia, sobrinho, sobrinha, bisavô ou bisavó.	18 (12,1)	2 (100)	16 (11,4)
• Primo ou prima	5 (3,3)	0 (0,0)	5 (3,57)
Diagnóstico obtido			
• Crohn	5 (3,3)	2 (100)	3 (2,1)
• Retocolite Ulcerativa	12 (8,1)	0 (0,0)	12 (8,6)
• Outras doenças	18 (12,1)	0 (0,0)	18 (12,8)
• Não informado	6 (4,0)	0 (0,0)	6 (4,3)

De acordo com a tabela 6, podemos verificar que a maior parte (72,2%) dos participantes do estudo não apresenta histórico familiar de agravos intestinais. O perfil segue semelhante quando comparados casos e controles. Além disso o grau de parentesco mais comum é de 2º ou 3º grau sendo o diagnóstico recebido por esses indivíduos de outras doenças não inflamatórias intestinais (12,1%) seguido da RCU (8,1%) e da DC (3,3). Dentre os casos, todos os diagnósticos dados foram de DC. Esses resultados reforçam outros estudos que demonstram que DNA de MAP é encontrado com uma frequência maior entre pacientes portadores da DC. Acredita-se que os pacientes infectados podem desenvolver o quadro intestinal na presença da bactéria associada a propensão genética para tal, como mutações no gene *Nod 2* associadas ao processamento alterado de produtos bacterianos (Fiocchi, 2012; Leite, 2012). Além disso, indivíduos infectados com o agente podem ser responsáveis pela contaminação de seus familiares através do contato direto ou contaminação de fômites.

3.2- Análise dos fatores de risco

À análise bivariada foram consideradas apenas variáveis que pudessem ser categorizadas em exposto e não exposto. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 7.

Apesar das diferenças exibidas na análise univariada, que sugerem possíveis fatores de risco, apenas a ingestão de leite e derivados informais demonstrou associação estatística (Odds= 13,39; IC= 1,57-298; Qui-quadrado= 9,12; p=0002). Essa associação já era esperada uma vez que MAP é eliminado por animais portadores da paratuberculose principalmente através

do leite e fezes. Dessa forma os indivíduos podem se contaminar através do consumo de produtos lácteos, principalmente aqueles não pasteurizados, uma vez que se sabe que a pasteurização pode não ser capaz de remover cargas bacterianas mais elevadas. Isso possivelmente ocorre devido a formação de grumos de bactérias, denominados “clumpings” de forma que as bactérias no interior dos grumos estariam protegidas por aquelas na face externa do mesmo.(Grant et., al 2002; Carvalho et., al 2012). Além da formação dos grumos, MAP também apresenta a formação de estruturas “spore like” que podem dificultar sua eliminação e favorecendo sua sobrevivência no ambiente, como em ambientes aquáticos, visto que MAP já foi identificado em água de consumo e água bruta. (Mishina et., al 1996; Pierce, 2009; Beumer et., al 2010 Lamont et., al 2012).

Outro fator investigado que demonstrou associação estatística foi o histórico de agravos intestinais entre familiares (Odds=8,42; IC=1,44-63,50; Qui-quadrado= 8,72; p= 0,003), reforçando o descrito por pesquisadores como Nancy et al (2008), Fiocchi, (2012), Leite, (2012) e Carvalho et al (2012) que sugerem o envolvimento de MAP em agravos intestinais, principalmente na DC.

Tabela 7-Distribuição de variáveis categorizadas em exposto e não exposto entre casos e controles e seus resultados a análise bivariada.

Variável	Exposto Não- exposto	Caso (N)	Controle (N)	Odds ratio (OD)	Intervalo de confiança 95% (IC)	Qui- quadrado (x ²)	P valor																									
Município de residência	Grande BH, Fora da capital	4	79	0,77	0,15-3,86	0,13	0,72																									
	Belo Horizonte	4	61					Ocupação	Exposto	5	69	1,62	0,32-8,95	0,42	0,51	Não exposto	3	67	Beneficiário de programa de benefício social	Exposto	2	13	9,77	0,88-109,20	6,91	0,008	Não exposto	2	127	Renda familiar	Exposto	3
Ocupação	Exposto	5	69	1,62	0,32-8,95	0,42	0,51																									
	Não exposto	3	67					Beneficiário de programa de benefício social	Exposto	2	13	9,77	0,88-109,20	6,91	0,008	Não exposto	2	127	Renda familiar	Exposto	3	90	0,63	0,12-3,16	0,38	0,53						
Beneficiário de programa de benefício social	Exposto	2	13	9,77	0,88-109,20	6,91	0,008																									
	Não exposto	2	127					Renda familiar	Exposto	3	90	0,63	0,12-3,16	0,38	0,53																	
Renda familiar	Exposto	3	90	0,63	0,12-3,16	0,38	0,53																									

	Não exposto	5	95				
Número de dependentes da renda	Exposto	4	85	0,61	0,12-3,07	0,46	0,49
	Não exposto	4	52				
Escolaridade	Exposto	3	71	0,58	0,11-2,95	0,53	0,46
	Não exposto	5	69				
Reside em casa própria	Exposto	1	46	0,29	0,01-2,48	1,45	0,22
	Não exposto	7	94				
Zona de residência	Exposto	3	21	3,40	0,59-18,20	2,82	0,09
	Não exposto	5	119				
Fonte da água para consumo	Exposto	3	27	2,51	0,44-13,16	1,55	0,21
	Não exposto	5	113				
Realiza tratamento da água para consumo	Exposto	0	9	0,00	0,00-11,73	0,55	0,45
	Não exposto	8	131				
Destino do esgoto sanitário	Exposto	3	24	2,88	0,50-15,21	2,07	0,15
	Não exposto	5	115				
Fumante	Exposto	5	46	3,41	0,67-18,95	2,94	0,08
	Não exposto	3	94				
Qual o diagnóstico	Exposto	5	90	0,87	0,17-4,84	0,03	0,85
	Não exposto	3	47				
A quem recorre quando apresenta algum problema intestinal	Exposto	2	41	0,67	0,09-3,95	0,22	0,63
	Não exposto	6	83				

Frequência de consumo de leite e derivados	Exposto	8	105	Indefinido	Indefinido	2,55	0,11
	Não exposto	0	34				
Produtos mais consumidos	Exposto	7	75	5,97	0,71-132,62	3,45	0,06
	Não exposto	1	64				

Consumo do leite informal	Exposto	8	46	13,39	1,57-298	9,12	0,002
	Não exposto	1	88				
Trata leite informal	Exposto	5	12	4,72	0,80-30,37	4,19	0,04
	Não exposto	3	34				
Possui histórico de agravos intestinais na família	Exposto	6	36	8,42	1,44-63,50	8,72	0,003
	Não exposto	2	101				
Diagnóstico obtido	Exposto	2	15	Indefinido	Indefinido	2,25	0,13
	Não exposto	0	18				

Conclusão

- Para a população estudada, o consumo de leite informal pode ser considerado um fator de risco para MAP em amostras de biópsias intestinais;
- A caracterização da população sugere alguns possíveis fatores de risco, como a realização de tratamento cirúrgico e histórico familiar de agravos intestinais, que podem ser confirmados a partir de um estudo com um número maior de casos.

Anexo I Questionário

QUESTIONÁRIO

Data: ___ / ___ / ___ Número do paciente: _____
Nome: _____
_ Data de Nascimento: ___ / ___ / ___ Sexo: M: ___ F ___
Endereço: _____
_ Município _____ Estado _____

Telefone: (____) _____ detecção de MAP? Sim () Não()
Doença inflamatória intestinal diagnosticada? Sim () Não()

1- Atualmente você está trabalhando?

- a) Sim
- b) Não
- c) Sem resposta

- e) Ensino fundamental completo
- f) Ensino fundamental incompleto
- g) Analfabeto
- f) Sem resposta

2- Qual sua ocupação?

3- Essa sempre foi sua ocupação?

- a) Sim
- b) Não (Qual foi a ocupação que você teve por mais tempo? _____)
- c) Sem resposta

8- A casa em que você residiu mais tempo em sua vida era?

- a) Própria
- b) Alugada
- c) Outra forma de ocupação
- d) Sem resposta

4- Você ou alguém da sua família participa (participou) de algum programa de benefício social? ex: bolsa família, projevem, etc.

- a) Sim (Qual? _____)
- b) Não
- c) Sem resposta

9- Você residiu a maior parte da sua vida em que região?

- a) Zona rural
- b) Zona urbana
- c) Sem resposta

5- Qual sua renda familiar?

6- quantas pessoas dependem dessa renda?

10- A água utilizada para consumo (beber, cozinhar) em sua casa provém de:

- a) Sistema de abastecimento público (Possui tratamento? SIM NÃO NÃO SEI)
- b) Poço raso
- c) Poço fundo
- d) Poço artesiano
- e) Água mineral
- f) Outro _____
- g) Sem resposta

7- Você possui formação em:

- a) Pós-graduado(a)
- b) Ensino superior completo
- c) Ensino superior incompleto
- d) Ensino médio

11- Você realiza algum tratamento com a água bebida em sua casa?

- a) Sim (qual? _____)

- b) Não
- c) Sem resposta

12- A água usada em sua casa é encaminhada para:

- a) Rede de esgoto da cidade
- b) Diretamente em algum rio
- c) Fossa séptica
- d) Céu aberto
- e) Outro
- f) Sem resposta.

13- Você fuma, ou já foi fumante?

- a) Sim, sou fumante (__maços/ dia).
- a) Sim, já fui fumante (__maços/ dia).
- b) Não
- c) Sem resposta

14- Você apresenta ou já apresentou algum sintoma relacionado ao aparelho intestinal?*

- a) Sim:
 - diarreia,
 - emagrecimento,
 - febre,
 - dor abdominal,
 - massa abdominal,
 - fístula enterocutânea, perianal,
 - Outro: _____
- b) Não (pule para questão 18)

15- Há quanto tempo você apresentou o sintoma relacionado ao aparelho intestinal?

- a) Esse ano
- b) Até 2 anos atrás
- c) De dois a cinco anos
- d) Cinco a dez anos
- e) Mais de dez anos
- f) Sem resposta

16- Qual foi o diagnóstico dado ao problema?

- a) Retocolite ulcerativa.
- b) Crohn
- c) Síndrome do Intestino irritável
- d) Doença Celíaca
- e) Câncer de intestino
- f) Doença diverticular dos cólons
- g) Outros.

Qual: _____

17- Qual o tratamento?

- a) Clínico (medicamentos orais, injetáveis). Quais:

- b) Cirúrgico: 1a Intervenção:

___/___/___ _____

2a Intervenção: ___/___/___

3a Intervenção: ___/___/___

Outras: _____

- c) Outro. Qual: _____

- d) Não houve tratamento.

18- Qual a extensão da doença?

- a) TGI superior
- b) Íleo terminal
- c) Ileocólon
- d) Cólon
- e) Perianal
- f) Sem resposta

19- O tratamento foi realizado em que local?

- a) Hospital das clínicas da UFMG
- b) Outro. Qual _____

20- Com que frequência você consome leite e derivados em sua casa?

- a) Mais de uma vez por dia
- b) Diariamente
- c) Três vezes por semana
- d) Menos de três vezes por semana
- e) Quinzenalmente
- f) Esporadicamente
- g) Não consome produtos lácteos
- h) Sem resposta

21- Qual a quantidade consumida por você desses produtos?

22-Quais os produtos mais consumidos em sua casa?

- a) Leite UAT (caixinha)
- b) Leite Pasteurizado (saquinho)
- c) Leite em pó
- d) Leite Informal (do leiteiro)
- e) Derivados feitos com leite pasteurizado (iogurte, queijos, requeijão, manteiga..)
- f) Derivados feitos a partir de leite não pasteurizado: queijo canastra, queijo do serro.
- g) Derivados informais (do leiteiro, fazendas...)
- h) Sem resposta

23- Caso consuma leite e derivados informais, realiza algum tratamento?

- a) Consomem cru
- b) Consomem fervido
- c) Apenas aquece
- d) Não consomem leite de leiteiros
- e) Sem resposta

24- O que te motiva na escolha do produto consumido?

- a) Preço
- b) Sabor
- c) Facilidade de compra
- d) Outros
- e) Sem resposta

22- Onde costuma comprar esses produtos?

- a) Supermercado
- b) Mercadinhos de bairro
- c) Feira
- d) Padaria
- e) Vendedores ambulantes
- f)

Outros _____

- g) Sem resposta

23- A quem você recorre quando tem algum problema gastrointestinal?

- a) Ao médico
- b) Toma remédios por conta própria
- c) Terapias alternativas (chás, etc.)
- d) Outros
- e) Sem resposta

24- Você tem algum parente que tem ou já teve algum problema intestinal?

- a) Sim
- b) Não (fim do questionário)

Qual o grau de parentesco?

- a) Pai/mãe/filho/filha
- b) Irmão/irmã/avô/avó
- c) Tio/tia/sobrinho/bisavô/ bisavô
- d) primo/prima

25- Qual a idade dessa pessoa ao diagnóstico?

- a) Recém-nascido
- b) Até 5 anos
- c) De 5 a 10 anos
- d) De 10 a 15 anos
- e) De 20 a 35 anos
- f) De 35 a 50 anos
- g) Mais de 50 anos
- h) Sem resposta.

26-Qual foi o diagnóstico dado ao problema?

- a) Retocolite ulcerativa.
- b) Crohn
- c) Síndrome do Intestino irritável
- d) Doença Celíaca
- e) Câncer de intestino
- f) Doença diverticular dos colons
- g) Outros. Qual: _____
- h) Sem resposta.

27- Qual o tratamento?

- a) Clínico (medicamentos orais, injetáveis). Quais:

- b) Cirúrgico
- c) Outro. Qual: _____

- d) Não houve tratamento

- e) Sem resposta.

28-O tratamento foi realizado em que local?

- a) Hospital das clínicas da UFMG
- b) Outro. Qual _____
- c) Não foi realizado tratamento
- d) Sem resposta.

29-Você saberia informar com que frequência essa pessoa consome leite e derivados em sua casa?

- a) Mais de uma vez por dia
- b) Diariamente

- c) Três vezes por semana
- d) Menos de três vezes por semana
- e) Quinzenalmente
- f) Esporadicamente
- g) Não consome produtos lácteos
- h) Sem resposta.

30-Quais os produtos mais consumidos por essa pessoa?

- a) Leite UAT (caixinha)
- b) Leite Pasteurizado (saquinho)
- c) Leite em pó
- d) Leite Informal (do leiteiro)
- e) Derivados feitos com leite pasteurizado (iogurte, queijos, requeijão, manteiga..)
- f) Derivados feitos a partir de leite não pasteurizado: queijo canastra, queijo do serro.
- g) Derivados informais (do leiteiro, fazendas...)
- h) Sem resposta.

31- Tem conhecimento se ela realiza algum tipo de tratamento com o leite consumido?

- a) Consome cru
- b) Consome fervido
- c) Apenas aquece
- d) Não consome leite de leiteiros
- e) Sem resposta

32- A pessoa a que se refere residiu a maior parte de sua vida em que tipo de região?

- a) Zona rural
- b) Zona urbana
- c) Sem resposta.

33-A casa em que essa pessoa reside:

- a) É própria
- b) É alugada
- c) Tem outra forma de ocupação
- d) Sem resposta.

34- Tem conhecimento de onde provém a água usada na casa de seu parente?

10- A água utilizada para consumo (beber, cozinhar) em sua casa provém de:

- a) Sistema de abastecimento público (Possui tratamento? SIM NÃO
 NÃO SEI)
- b) Poço raso
- c) Poço fundo
- d) Poço artesiano
- e) Água mineral
- f) Outro _____
- g) Sem resposta

35-A água usada na casa de seu parente é encaminhada para:

- a) Rede de esgoto da cidade
- b) Diretamente em algum rio
- c) Fossa séptica
- d) Outro
- e) Sem resposta.

36- Essa pessoa participa de algum programa de benefício social? ex: bolsa família, projuvem, etc.

- a) Sim(Qual?_____)
- b) Não
- c) Sem resposta.

37- Qual a formação de seu parente?

- a) Pós-graduado(a)
- b) Ensino superior completo
- c) Ensino superior incompleto
- d) Ensino médio
- e) Ensino fundamental completo
- f) Ensino fundamental incompleto
- g) Analfabeto
- f) Sem resposta

38- Qual a ocupação da pessoa referida?

- _____
- _____
- Sem resposta.

39- Essa sempre foi a ocupação dessa pessoa?

- a) Sim
- b) Não (saberia informar qual foi a ocupação que essa pessoa teve durante mais tempo em sua vida?_____)

39- Esse indivíduo é ou já foi fumante?

- a) Sim
- b) Não
- c) Sem resposta.

Anexo II Parecer Comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0471.0.203.000-10

Interessado(a): Profa. Maria de Lourdes de Abreu Ferrari
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 21 de janeiro de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Mycobacterium avium paratuberculosis (MAP): presença em amostras de leite pasteurizado e sua relação com doença de Crohn"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo III Agrupamento De Ocupações

Agrupamento 1

Banqueiro; deputado; senador; diplomata; capitalista; alto posto militar (como general); alto cargo de chefia ou gerência em grandes organizações; alto posto administrativo no serviço público; grande industrial (empresas com mais de 100 empregados); grande proprietário rural (com mais de 2.000 hectares); outras ocupações com características semelhantes.

Agrupamento 2:

Profissional liberal de nível universitário (como médico, engenheiro, arquiteto, advogado, dentista, etc.); cargo técnico-científico (como pesquisador, químico industrial, professor de universidade, jornalista ou outra ocupação de nível superior); cargo de chefia ou gerência em empresa comercial ou industrial de porte médio (10 a 100 empregados); posto militar de tenente, capitão, major, coronel; grande comerciante; dono de propriedade rural (de 200 a 2.000 hectares); e outras ocupações com características semelhantes.

Agrupamento 3:

Bancário; oficial de justiça; professor primário e secundário; despachante; representante comercial; auxiliar administrativo; auxiliar de escritório ou outra ocupação que exija curso de Ensino Fundamental completo, incluindo funcionário público com esse nível de instrução e que exerce atividades semelhantes; posto militar de sargento, subtenente e equivalentes; pequeno industrial (até 10 empregados); comerciante médio; proprietário rural (de 20 a 200 hectares); e outras ocupações com características semelhantes.

Agrupamento 4:

Datilógrafo; telefonista; mecanógrafo; contínuo; recepcionista; motorista (empregado); cozinheiro e garçom de restaurante; costureiro; operário qualificado (que tem um mínimo de aprendizado profissional, como mecânico, gráfico, metalúrgico, ferramenteiro); porteiro; chefe de turma; mestre de produção fabril; serralheiro; marceneiro; comerciário, como balconista, empregado de loja de artigos finos ou de estabelecimento comercial de grande porte (casa de roupa, sapataria, joalheria, farmácia, drogaria, lojas de aparelhos domésticos, imobiliárias); funcionário público no exercício de

atividades semelhantes; posto militar de soldado, cabo e equivalentes; pequeno comerciante; sitiante; pequeno proprietário rural (até 20 hectares); e outras ocupações com características semelhantes.

Agrupamento 5:

Operário (não qualificado); servente; carregador; empregada doméstica, como cozinheira, passadeira, lavadeira, arrumadeira; lixeiro; biscateiro; faxineiro; lavador; garrafeiro; pedreiro; garçom de botequim; lavrador ou agricultor (assalariado); meeiro; caixeiro de armazém ou de outro pequeno estabelecimento comercial varejista (quitanda, mercearia, peixaria, lanchonete, lojas de ferragens); e outras ocupações com características semelhantes.

Agrupamento 6

Dona de casa, estudante

Referências

Berquó, L. S, Aluísio Barros, J D Lima, R.C E Bertoldi, A. D. Utilização De Antimicrobianos Em Uma População Urbana. Ver. Saúde Pública,;38(2);239-46, 2004

Beumer, A; King,D;Donohue,M; Mistry, J; Covert,T E Pfaller, S, Applied And Environmental Microbiology, Vol 76 No21,Nov., P. 7367–7370, 2010

Carvalho, I.A., Pietralonga, P.A.G., Schwarz, D. G. G. , Faria, A.C.S., Moreira, M.A.S. Short Communication: Recovery Of Viable *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* From Retail Pasteurized Whole Milk In Brazil. J. Dairy Sci. 95 :6946–6948, 2012.

Carvalho, I.A., Schwarz, D. G. G. , Pietralonga, P.A.G., Faria, A.C.S., Espechit, I. F. B., Moreira, M.A.S. Iv; - Presence Of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* (Map). Brazilian Patients With Inflammatory Bowel Diseases And Controls. São Paulo Medical Journal- Prelo

CDC- Centers For Diseases Control. Disponível Em: <www.dpd.cdc.gov >.

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

Faria, A.C.S., Schwarz, D.G.G., Carvalho, I.A., Rocha, B.B., De Carvalho Castro, K.N., Silva, M.R., Moreira, M.A.S. Short Communication: Viable

Mycobacterium avium Subspecies *Paratuberculosis* In Retail Artisanal Coalho Cheese From Northeastern Brazil. 97, 7, 4111–4114, 2014.

Fiocchi, C., Etiopatogênese Da Doença Inflamatória Intestinal. Em: Cardozo Ws, Sobrado Cw. Doença Inflamatória Intestinal. Barueri: Manole; 2012.

Grant, I. R., Ball, H. E Rowe, M. T. Incidence Of *Mycobacterium Paratuberculosis* In Bulk Raw And Commercially Pasteurized Cows' Milk From Approved Dairy Processing Establishments In The United Kingdom. Applied And Environmental Microbiology, V.68, N.5, P.2428-2435. 2002a

Grant, I. R., Hitchings, E. I., McCartney, A., Ferguson, F. E Rowe, M. T. Effect Of Commercial-Scale High-Temperature, Short-Time Pasteurization On The Viability Of *Mycobacterium Paratuberculosis* In Naturally Infected Cows' Milk. Applied And Environmental Microbiology, V.68, N.2, P.602-607. 2002b.

Lamont, E.A., Bannantine, J.P., Armién, A., Ariyakumar, D.S. And Sreevatsan, S. Identification And Characterization Of A Spore-Like Morphotype In Chronically Starved *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis* Cultures. Plos One, 7 (1):E30648. (2012)Doi:10.1371/Journal.Pone.0030648

Leite, A.Z.A., Epidemiologia Da Doença Inflamatória Intestinal. Em: Cardozo Ws, Sobrado Cw. Doença Inflamatória Intestinal. Barueri: Manole; P.11-15, 2012.

Mishina D, Katsel P, Brown St, On The Etiology Of Crohn Disease. Proc Natl Acad Sci U S A;93:9816–20, 1996

Nacy, C., Buckley, M. *Mycobacterium avium Paratuberculosis*: Infrequent Human Pathogen Or Public Health Threat? American Society For Microbiology, Washington, 2008

Naser, S. A., Schwartz, D. E Shafran, I. Isolation Of *Mycobacterium avium* Subsp *Paratuberculosis* From Breast Milk Of Crohn's Disease Patients. American Journal Of Gastroenterology, V.95, N.4, P.1094-1095. 2000.

Pierce E.S. - Possible Transmission Of *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* Through Potable Water: Lessons From An Urban Cluster Of Crohn's Disease- Gut Pathogens– P. 1-17, 2009

Prantera C, Bothamley G, Levenstein S, Crohn's Disease And Mycobacteria: Two Cases Of Crohn's Disease With High Anti-Mycobacterial Antibody Levels Cured By Dapsone Therapy. Biomed Pharmacother 43, 295-299, 1989.

Sands, B.E. Crohn's Disease. Sleisenger And Fordtran's Gastrointestinal And Liver Disease. Philadelphia: Saunders Elsevier, P. 2459-2498, 2006

Sung, N., E. M. T. Collins. Thermal Tolerance Of Mycobacterium *Paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol* 64, 999-1005, 1998.

Sweeney, R. W. Transmission Of *Paratuberculosis*. *Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice*, V.12, N.2, P.305-312. 1996.

Whan L. B. Gran I.R. Bactericidal Effect Of Chlorine On Mycobacterium *Paratuberculosis* In Drinking Water. *Letters In Applied Microbiology*. V.33, N.3, P.227-231, 2001

Conclusões gerais

- Em vista dos grandes rebanhos que países latino-americanos possuem e a importância da atividade agropecuária nos mesmos, assim como o comércio (importação e exportação) de animais e produtos, o interesse em MAP pode ser considerado baixo ou ausente para determinados países.
 - Os países que realizaram o maior número de pesquisas foram Brasil, Argentina e Chile.
 - As técnicas utilizadas na maioria dos estudos foram o cultivo, o ELISA e a PCR. Estudos para a caracterização molecular das cepas encontradas não são costumeiramente realizados.
- Com relação a detecção de MAP na água
 - MAP foi identificado em amostras de água para consumo humano e animal em propriedades de caprinocultura leiteira amostradas na Zona da Mata mineira.
- A análise univariada dos dados dos questionários aplicados aos proprietários das propriedades de caprinocultura leiteira da Zona da Mata aponta possíveis fatores de risco, que se destacaram na análise univariada.
- Com relação ao estudo caso-controle pode-se concluir
 - Para a população estudada, o consumo de leite informal e o histórico familiar de agravos intestinais podem ser considerados fator de risco para MAP em amostras de biópsias intestinais;
 - A caracterização da população sugere alguns possíveis fatores de risco, como a realização de tratamento cirúrgico e histórico familiar de agravos intestinais, que podem ser confirmados a partir de um estudo com um número maior de casos.