

Ocorrência de paratuberculose em caprinos e ovinos no município de Patos de Minas (MG)

Occurrence of paratuberculosis in goats and sheep in Patos de Minas (MG)

LUIZ CLÁUDIO SOUSA BARBOSA

Discente do curso de Medicina Veterinária (UNIPAM)

E-mail: luizcsb@unipam.edu.br

DANIELLE RODRIGUES MACHADO

Discente do curso de Medicina Veterinária (UNIPAM)

E-mail: daniellerm@unipam.edu.br

NÁDIA GRANDI BOMBONATO

Professora Orientadora (UNIPAM)

E-mail: nadia@unipam.edu.br

Resumo: A paratuberculose é uma enfermidade de importância mundial que acomete ruminantes e animais silvestres. Em caprinos e ovinos, a principal manifestação clínica é emagrecimento progressivo, diferentemente dos bovinos, a diarreia não é um sinal muito comum. Devido ao escasso número de estudos sobre o tema e à grande importância dos resultados para o comércio da carne e para a saúde pública, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de paratuberculose em pequenos ruminantes do município de Patos de Minas, Minas Gerais. Foram coletadas amostras de sangue e de fezes de 30 ovinos e de 25 caprinos, para a detecção de anticorpos anti-Map, utilizando-se do teste ELISA Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis IDEXX®. As amostras de fezes foram fixadas em lâminas de vidro e coradas através da técnica de Zielh Neelsen. De acordo com os testes realizados, não foram detectados anticorpos anti-Map em nenhuma das amostras de soro sanguíneo e não foi identificada a presença de bacilos álcool-ácido-resistentes nas amostras de fezes. Dessa forma se faz necessário um estudo mais profundo e com um maior número de animais para verificar a realidade dessa doença na região e a introdução de um teste diagnóstico com maior sensibilidade em infecções subclínicas.

Palavras-chave: Doença de Johne. ELISA. Pequenos ruminantes. Ziehl-neelsen.

Abstract: Paratuberculosis is a worldwide disease that affects ruminants and wild animals. In goats and sheep, the main clinical manifestation is progressive weight loss, unlike cattle, diarrhea is not a very common sign. The objective of this work was to verify the occurrence of paratuberculosis in small ruminants in the city of Patos de Minas, Minas Gerais. Due to the scarce number of studies on the subject and the great importance of the results for the meat trade and for public health, the purpose of this work was to verify the occurrence of paratuberculosis in small ruminants in Patos de Minas, Minas Gerais. Blood and feces samples were collected from 30 sheep and 25 goats, for the detection of anti-Map antibodies, using the ELISA test Mycobacterium avium subsp. IDEXX® paratuberculosis. Stool samples were fixed on glass slides and stained using the Zielh Neelsen technique. According to the tests carried out, anti-Map antibodies were not detected in any of the blood serum samples and the presence of alcohol-acid-

resistant bacilli was not identified in the stool samples. Thus, a deeper study with a larger number of animals is needed to verify the reality of this disease in the region and the introduction of a diagnostic test with greater sensitivity in subclinical infections.

Keywords: Johne's Disease. ELISA. Small ruminants. Ziehl-neelsen.

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura e a ovinocultura são atividades distribuídas por todo território nacional, mas com uma centralização, em especial do caprino, na região do semiárido brasileiro (IBGE, 2016). Há séculos, a resistência dos caprinos e dos ovinos frente às adversidades climáticas são conhecidas, pelo processo de adaptação, seleção natural e por influência do homem. Apesar de um crescente aumento na criação de pequenos ruminantes, fatores ligados à nutrição, à sanidade e à reprodução podem influenciar na queda da produção, devido à direta ligação com o crescimento desses animais. Ao falar sobre sanidade, podem-se destacar problemas como intoxicação e toxinfecção, doenças nutricionais e metabólicas, neoplasias e principalmente as doenças infecciosas e parasitárias (SIMÕES *et al.*, 2016).

A doença de Johne ou paratuberculose é uma doença bacteriana contagiosa de caráter crônico, considerada uma doença transmissível de impacto econômico e social, cujo controle é necessário devido à importância para o comércio internacional de animais e alimentos de origem animal. Essa enfermidade acomete o intestino e afeta principalmente ruminantes como ovinos, bovinos (mais comumente vacas leiteiras), cabras, bubalinos, entre outras espécies. A doença é caracterizada por caquexia de evolução lenta e por enterite que se torna cada vez mais grave (BUCZINSKI *et al.*, 2019).

De acordo com Windsor (2015), o abate prematuro e a morte também podem ser considerados como consequência da doença, pois ela causa emagrecimento progressivo e diarreia crônica. Diagnóstico ante-mortem para paratuberculose se tornou um ponto crítico para as estratégias de controle. No diagnóstico, post-mortem essas lesões encontram-se no trato intestinal e linfonodos mesentéricos, podendo ser encontradas também no intestino grosso, porém em menor proporção (MOTA *et al.*, 2010).

O microrganismo é transmitido principalmente pela via orofecal. Pode ser excretado em colostro e leite através de animais infectados. A infecção pode também ser transmitida pelo útero. A infecção geralmente acontece no início da vida desses animais, mas pode levar de 2 a 14 anos até que o animal manifeste sinais clínicos, dependendo da quantidade de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) ingerida, espécie animal e prevalência dentro da fazenda (BAUMAN *et al.*, 2016).

Considerando a importância da paratuberculose e a escassez de pesquisas em pequenos ruminantes, objetivou-se, por meio deste estudo, verificar a ocorrência da doença, os aspectos clínicos, epidemiológicos e sorológicos em caprinos e ovinos no município de Patos de Minas (MG).

2 METODOLOGIA

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), sob Protocolo de número 161/19.

A pesquisa foi realizada no mês de setembro de 2020 em dois rebanhos, sendo analisados 25 caprinos entre 2 a 7 anos de idade, de caprinocultura leiteira, e 30 ovinos entre 8 meses a 3 anos, de ovinocultura para corte no município de Patos de Minas (MG). As amostras foram coletadas de forma aleatória nas propriedades.

A propriedade que cria ovinos com aptidão para corte possui fêmeas e machos mestiços da raça Santa Inês criados em sistema semi-intensivo, onde os animais recebem alimentação no cocho e tem acesso a piquete. As fêmeas e os machos ficam separados, e os borregos são separados das mães assim que a alimentação deles passar a ser baseada em silagem de milho. Os animais recebem ração de ovinos duas vezes ao dia, sal mineral à vontade no cocho, além do pastoreio em piquete de capim Tifton. Durante a noite, os animais ficam no aprisco e são liberados de dia para o pastejo. A criação de ovinos é destinada para o ensino e pesquisa do Centro Universitário em aulas do curso de Medicina Veterinária e Zootecnia. Quanto ao manejo sanitário, os animais são vacinados e vermifugados de acordo com o protocolo estabelecido para pequenos ruminantes. Na época do experimento os ovinos apresentavam escore corporal 3, considerado o adequado para a produção, não apresentavam diarreia, além de não terem histórico de emagrecimento progressivo.

A propriedade que cria cabras de aptidão leiteira possui animais mestiços da raça Saanen, Toggenburg e Anglonubiana. O leite é beneficiado por meio de pasteurização lenta, inspecionado pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM), embalado e destinado para comercialização. Os animais ficam soltos em piquetes durante o dia e à noite se abrigam em aprisco. A alimentação é baseada em ração própria para cabras em lactação durante o momento da ordenha, além de silagem de milho e capim. Os animais são vermifugados duas vezes ao ano e recebem as vacinas de acordo com ocorrência de doenças na propriedade. As cabras e os cabritos de diferentes idades convivem em um mesmo espaço, além do convívio com animais de diferentes espécies, como ovinos, equinos, bovinos, cães e aves. Na propriedade, na época das coletas, foram identificadas cabras com escore abaixo de 2 e 3 animais com diarreia.

Foi realizada a coleta das amostras biológicas através de contenção manual dos animais, de acordo com a técnica de imobilização de ovinos e caprinos. Foram coletados aproximadamente 5 mL de sangue por meio de punção da veia jugular, com seringa e agulha 25mm x 0,8mm, estéril. As amostras foram mantidas em refrigeração em caixas de isopor com gelo; em seguida, encaminhadas para o Laboratório de Patologia Clínica do Centro Clínico Veterinário – CCV do Centro Universitário de Patos de Minas e submetidas à centrifugação a 3.500 rpm durante dez minutos para a extração do soro. As amostras de soro foram congeladas em tubo de polietileno com fundo cônico em uma temperatura de -20°C até a realização dos exames.

As amostras de fezes foram coletadas diretamente na ampola retal dos animais; em seguida, foram realizados os esfregaços em lâminas com auxílio de Swab. As lâminas, depois de prontas, foram coradas com a técnica de Ziehl-Neelsen para

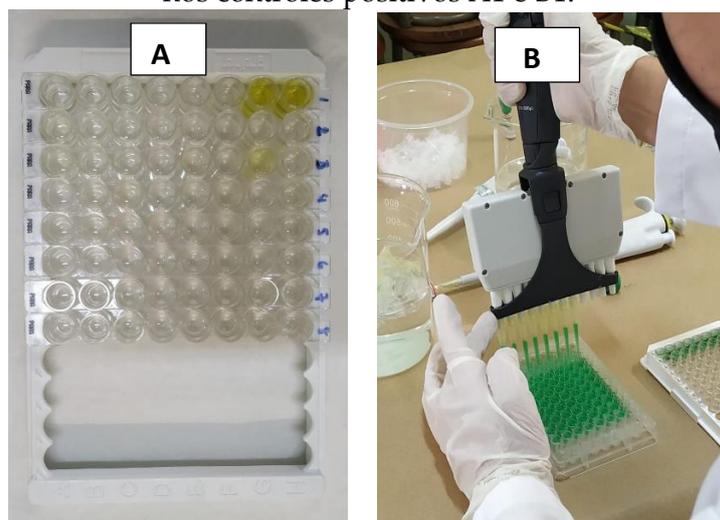
identificação dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) também no Laboratório de Patologia Clínica do Centro Clínico Veterinário – CCV do Centro Universitário de Patos de Minas.

Para detectar os anticorpos anti-MAP nas amostras, foi utilizado o kit comercial de ELISA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Antibody Test – IDEXX®. Os testes foram realizados no Laboratório de Doenças Infecciosas do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de controle positivo (CP) e negativo (CN) foram diluídas em placa não impregnada na proporção 1:20 e pré-incubadas por 2 horas à temperatura de 22°C (Figura 1). Em seguida, transferidos 100µL do conteúdo das cavidades à placa impregnada, a qual foi incubada por 45 minutos. Posteriormente, o conteúdo líquido das cavidades foi removido e realizadas 3 lavagens com solução de lavagem própria do kit. Em seguida, adicionados 100µL do conjugado Horseradish Peroxidase – HRP na proporção 1:100, e a placa novamente ficou incubada por 30 minutos. Após isso, foi realizada a remoção do conteúdo líquido e procedida a lavagem por 3 vezes. Posteriormente, foram adicionadas 100µL do substrato custom tetrametilbencidina (TMB), um substrato cromogênico estabilizado, e a placa foi incubada durante 10 minutos. Para o bloqueio da reação, foram adicionados 100µL de solução de interrupção (Figura 1). Os valores de densidade óptica (DO) das amostras e controles foram medidos em espectrofotômetro de placas a 450nm.

Para validação dos exames utilizamos os seguintes critérios: $CPx \geq 0,350$ e $CPx / CN(DO\ 450) \geq 3,00$. O cálculo dos resultados foi determinado pela relação: $100 \times [(Amostra\ A(450) - CN(DO\ 450)) / (CPx - CN(DO\ 450))]$. Para interpretação dos resultados, consideraram-se os seguintes parâmetros: amostras com relação $A/P\% \leq 45\%$ Negativas; $45\% < A/P\% < 55\%$ Suspeitas e $A/P\% \geq 55\%$ Positivas

Figura 1-A: Diluição de amostras em placa não impregnada na proporção 1:20 para pré-incubação. **1-B -** Placa após solução de interrupção, apresentando reação específica nos controles positivos A1 e B1.



Fonte: arquivo dos autores, 2020.

Os esfregaços de fezes foram fixados à chama em bico de bunsen e, em seguida,

cobertos pelo corante fucsina fenicada. As lâminas então foram aquecidas em placa aquecedora até liberarem vapores. Após lavadas em água corrente, foi realizada a descoloração durante dois minutos, com solução de álcool-ácido. Em seguida, o esfregaço foi coberto com o corante azul de metileno por um minuto. Foi realizada nova lavagem em água corrente; após secar em papel filtro, as lâminas foram examinadas no microscópio óptico com objetiva de imersão (100x).

Os esfregaços foram classificados em negativos ou positivos de acordo com a presença ou ausência de BAAR característicos: negativo - ausência de BAAR compatíveis com *M. avium subsp. paratuberculosis*; e positivo - presença de BAAR de morfologia atípica ou de grande quantidade de BAAR de forma isolada ou presença de agregados de BAAR compatíveis com o agente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado do teste sorológico das duas propriedades foi negativo para anticorpos contra o MAP (*Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*) nos 55 animais testados.

Segundo Whitlock *et al.* (2000), o teste de ELISA é de grande validade para o diagnóstico, mas a sensibilidade é maior em animais que estão eliminando grande quantidade de bacilos nas fezes chegando a 75%; por outro lado, em animais de baixa eliminação, a sensibilidade cai para 15%. Estudos sorológicos da paratuberculose demonstraram grande variação nos resultados provenientes dos testes, o que deixa evidente a necessidade de se intitular a padronização deles para otimizar a sensibilidade e a especificidade dos diagnósticos, sendo assim o diagnóstico deve ser obtido através de associação de diferentes técnicas laboratoriais (YAMASAKI *et al.*, 2013). Neste caso, em animais em que a infecção ainda se apresenta de forma subclínica, o teste ELISA pode não ter sensibilidade para detectar a doença, podendo subestimar os resultados, portanto, na pesquisa, foi associado o esfregaço de fezes corado com a técnica de Ziehl-Neelsen, em que as lâminas não apresentaram bacilos característicos com o da paratuberculose, confirmando o resultado do sorológico ELISA.

De acordo com Medeiros *et al.*, (2012), foram testadas 734 amostras de soro de caprinos e 392 de ovinos de 46 propriedades onde 44 (95,65%) apresentaram ao menos um animal positivo para paratuberculose no estado da Paraíba. Também na Paraíba foram testados 486 bovinos de 36 fazendas e descrita a presença de anticorpos anti-Map em 21 delas que não tinham histórico da doença (MEDEIROS *et al.*, 2012). O resultado desses trabalhos nos faz suspeitar ainda mais da existência de paratuberculose no estado de Minas Gerais, e o resultado negativo obtido neste trabalho só nos estimula ainda mais a pesquisar e a entender a enfermidade e a buscar cada vez mais obter informações sobre o quanto ela pode atingir nossos rebanhos.

As perdas causadas pela doença são significativas principalmente em rebanhos leiteiros, em que a doença está relacionada à redução na produção de leite, à perda de peso, ao abate prematuro e à desvalorização da carcaça, além de baixa eficiência reprodutiva (OIE, 2012). A produtividade é fator importante para as duas propriedades da pesquisa, já que dependem do leite das cabras e da carne dos carneiros para gerar renda – uma doença como a paratuberculose pode causar grande prejuízo. O prejuízo

econômico que a paratuberculose causa na pecuária mundial ainda não foi claramente mensurado; tendo como exemplo os Estados Unidos, estima-se que os prejuízos causados pela doença em geral chegam a 250 milhões de dólares por ano (YAMASAKI *et al.*, 2013).

Oliveira *et al.* (2010) afirmam que indivíduos em rebanhos de criação intensiva com um grande número de animais elevam as chances de ocorrer a doença devido ao contato dos animais com um maior número de fezes que possam estar contaminadas e que a criação de pequenos ruminantes junto a grandes ruminantes também aumenta as chances de contaminação cruzada. Cerca de 1/3 dos animais jovens que são expostos ao bacilo estão cronicamente infectados, dependendo do número de bacilos ingeridos e da resposta imune do indivíduo infectado (LILENBAUM *et al.*, 2007). Os animais da propriedade de caprinos leiteiros mantinham contato direto com os bovinos e os ovinos, compartilhando cochos e dormindo em locais com acúmulo de fezes, o que pode facilitar a possível transmissão do Map.

Alguns fatores são agravantes para a difusão do agente no rebanho, como densidade populacional, manejo de pastagens, sistema de criação, estresse, transporte, parto, deficiências nutricionais, estados de imunossupressão e fornecimento de colostro (SÁ *et al.*, 2013). O contato de cordeiros com as fezes de animais adultos infectados é considerado como o fator de risco mais importante na transmissão (DORE *et al.*, 2012). Os cabritos da propriedade leiteira convivem com cordeiros, além de permanecerem com as mães até a vida adulta. Consomem leite de cabra *in natura*, o que pode potencializar a transmissão de várias doenças, incluindo a paratuberculose.

De acordo com o resultado da pesquisa, surge a necessidade de se estudar os parâmetros de diagnóstico para paratuberculose levando em consideração a especificidade e a sensibilidade dos testes, pois sabemos que a doença gera grandes prejuízos. A falta de conhecimento de alguns produtores e a falta de pesquisas no estado de Minas Gerais podem negligenciar a existência da doença e afetar a produção e a comercialização dos produtos de caprinos e ovinos.

Nos dias de hoje, testes utilizando o PCR (Polymerase Chain Reaction) são importantes ferramentas de detecção de particularidades genéticas, o que adquire maior sensibilidade aos testes na identificação da infecção em sua forma subclínica (LOGAR *et al.*, 2012). Diagnósticos através de testes que detectam a resposta imune celular são utilizados para diagnosticar a doença em seu estágio inicial (TIMMS *et al.*, 2011). O intradérmico foi um teste muito utilizado, mas devido a sua inespecificidade se tornou limitado; nele se avalia a resposta imune celular através da hipersensibilidade. Os testes cervicais comparativos (TCC) com PPD ("protein purified derivative") foram avaliados por estudiosos brasileiros e identificou-se reação edematosa no local de inoculação do PPD aviário e ausência de reação no PPD de mamíferos em bovinos e ovinos com paratuberculose (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os resultados da pesquisa devem ser analisados com cuidado, pois a reação do PPD aviário pode estar relacionada à exposição do animal a outros agentes do grupo *Micobacterium* (*M. bovis*, *M. Avium* e Map) (LILENBAUM *et al.*, 2007).

Em estudo relatado por Oliveira *et al.* (2010), tanto no teste de tuberculinização simples quanto no comparativo para *M. avium*, foram obtidos altos números de diagnósticos inconclusivos, em que dos 187 ovinos avaliados 115 foram classificados

como inconclusivos, e em um dos animais o teste não detectou a presença do *Micobacterium*, sendo que esse animal apresentava lesões intestinais características, sugerindo então que o método é pouco eficiente em diagnósticos subclínicos, apesar de ser o teste de eleição para essa fase da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

4 CONCLUSÃO

Não foi observada a ocorrência de anticorpos anti-MAP nem de bacilos álcool-ácidos resistentes em caprinos e ovinos das propriedades analisadas. Faz-se necessário um estudo mais profundo com um maior número de animais para verificar a realidade dessa doença na região. A introdução de outro teste diagnóstico como o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) seria importante para garantir maior sensibilidade.

REFERÊNCIAS

- BAUMAN, Cathy A. *et al.* Prevalence of paratuberculosis in the dairy goat and dairy sheep industries in Ontario, Canada. **The Canadian Veterinary Journal**. Canada, p. 169-175, fev. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4712996/#>
- BUCZINSKI, S. *et al.* Accuracy of paratuberculosis diagnostic tests in small ruminants: protocol for a systematic review and meta-analysis: protocol for a systematic review and meta-analysis. **Animal Health Research Reviews**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 98-102, jun. 2019. Cambridge University Press (CUP).
- DORE, E. *et al.* Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis to calves within dairy herd: a systematic review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 1: p. 32-45, 2012.
- IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática. **Pesquisa Pecuária Municipal 2016**. Tabela 3939: efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho, 1974 a 2016. [Rio de Janeiro, 2016].
- MEDEIROS, João M. A. *et al.* Paratuberculose em caprinos e ovinos no Estado da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 111-115, fev. 2012.
- MEDEIROS, João Marcos de Araújo *et al.* Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 32, n. 8, p. 697-700, ago. 2012.
- MOTA, R. A. *et al.* Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasil**, v. 30, n. 3, 2010.
- LILENBAUM, W. *et al.* Paratuberculose: an update. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 580-590, 2007.

LOGAR K. *et al.* Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. **BMC Vet. Res.**, v. 8, n. 49, 2012.

OIE 2012. **World Organization for Animal Health**. 2012. Disponível em:
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf

OLIVEIRA D. M. *et al.* 2010. [Paratuberculosis in goats and sheep in Brazil] Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 30, n. 1, p. 67- 72, 2010. (Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos, Universidade Federal de Campina Grande).

SÁ, Luenda de M. *et al.* Avaliação sorológica e de fatores de risco para a infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em rebanhos leiteiros da Microrregião de Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 310-314, mar. 2013.

SIMÕES, Luciana *et al.* Leptospirose – Revisão. **Pubvet**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 138-146, jan. 2016.

TIMMS, Verlaine J. *et al.* How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 1-8, abr. 2011.

WHITLOCK, R. H. *et al.* ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. **Veterinary Microbiology**, v. 77, p. 387-398, 2000.

WINDSOR, P. A. Paratuberculosis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 181, n. 1-2, p. 161-169, dez. 2015.

YAMASAKI, Elise M. *et al.* Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 127-140, fev. 2013.