

Investigação da paratuberculose em rebanhos de fêmeas bubalinas

Investigation of paratuberculosis in herds of buffalo females

Josimar dos Reis Santana¹; Breno Vinícius Gonçalves da Silva¹; Fellipe Caldas Rodrigues¹; João Paulo Ferreira Gomes¹; Mariana Assunção de Souza²

1 Bacharel em Medicina Veterinária. Centro Universitário de Patos de Minas - Unipam

2 Doutora em Ciências Veterinárias. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas - Unipam.

E-mail: marianaa@unipam.edu.br (autora correspondente).

Resumo: A paratuberculose é considerada uma doença de origem infecciosa de caráter crônico, que acomete ruminantes domésticos e selvagens. O agente causador dessa enfermidade, também conhecida como Doença de Johne, é o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), que causa enterite granulomatosa nos animais infectados. As principais manifestações clínicas observadas são a diarreia crônica profusa e a perda de peso, sem redução do apetite. Objetivou-se com este estudo realizar a investigação da paratuberculose em rebanhos bubalinos leiteiros das regiões do Alto Paranaíba e Noroeste de Minas Gerais. Foram coletadas amostras em 54 búfalas, provenientes de cinco rebanhos de propriedades diferentes. De cada animal foram colhidas amostras de sangue, leite e fezes. Para a detecção de anticorpos anti-Map, utilizou-se o 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. Não foram detectados anticorpos anti-Map em nenhuma das amostras de leite ou soro sanguíneo e também não foi identificada a presença de bacilos álcool-ácido-resistentes nas amostras de fezes. São poucos os estudos a respeito da paratuberculose em rebanhos bubalinos. Em Minas Gerais ainda não foi relatada a infecção em búfalos, sendo necessário, portanto, mais estudos com maior quantidade de animais e de propriedades para que seja possível estabelecer a real prevalência da infecção no Estado.

Palavras-chave: búfalas; fezes; *Mycobacterium avium* subsp; *Paratuberculosis*.

Abstract: Paratuberculosis is considered a chronically infectious disease that affects domestic and wild ruminants. The causative agent of this disease, also known as Johne's disease, is *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (Map), which causes granulomatous enteritis in infected animals. The main clinical manifestations observed are chronic profuse diarrhea and weight loss without a reduction in appetite. The aim of this study was to investigate paratuberculosis in dairy buffalo herds in the Alto Paranaíba and Northwest regions of Minas Gerais. Samples were collected from 54 female buffaloes from five different herds. Blood, milk and fecal samples were collected from each animal. The IDEXX® *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA test was used to detect anti-Map antibodies. Fecal samples were fixed on glass slides and stained using the Zielh Neelsen technique. No anti-Map antibodies were detected in any of the milk or blood serum samples, and no acid-fast bacilli were identified in the fecal samples. There are few studies on paratuberculosis in buffalo herds. In Minas Gerais, infection in buffaloes has not yet been reported, necessitating further studies with a larger numbers of animals and herds to establish the true prevalence of the infection in the state.

Keywords: buffaloes; feces; *Mycobacterium avium* subsp; *Paratuberculosis*.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, é cada vez mais comum o consumo de produtos oriundos de bubalinos, como o queijo. Segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB, 2022), observa-se crescimento anual de 20 a 30%. De acordo com Pignata *et al.* (2014), isso se deve à maior concentração de gordura, proteína, lactose e sólidos totais no leite das búfalas em relação ao leite de vacas, tornando-se, assim, possível produzir mais peças com menor quantidade de leite. Porém, é necessário que o rebanho tenha uma boa saúde. Entre as doenças que afetam a sanidade, destaca-se a paratuberculose.

Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, existem no Brasil 4 raças reconhecidas: Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi e Carabao, sendo a raça Murrah considerada de maior aptidão leiteira; já as outras são de dupla aptidão (carne e leite). No ano de 2017, a população de búfalos no Brasil era de 1.381.395 cabeças de todas as raças. Na região Norte, há a maior quantidade de animais, sendo que o estado que lidera é o Pará, com 37,16%. Minas Gerais ocupa a sexta posição, com 66.613 cabeças de bubalinos, o que corresponde a 4,82% do rebanho nacional (IBGE, 2017).

Essa importante representatividade no mercado agropecuário alerta para adoção de medidas sanitárias como investigação de doenças nos rebanhos, para garantir competitividade e qualidade aos produtos. A paratuberculose, também conhecida como doença de John, é uma enfermidade que acomete mamíferos, geralmente ruminantes domésticos ou selvagens. É causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map)

descrito como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (MOTA *et al.*, 2010). O lugar de preferência para replicação do Map são os macrófagos da lâmina própria do intestino delgado e grosso; sua principal característica é a enterite granulomatosa crônica e infecciosa. A eliminação do agente ocorre através de fezes, leite e colostro de animais infectados (SILVA FILHO *et al.*, 2018).

De acordo com Medeiros *et al.* (2012), a introdução do agente no organismo do animal geralmente ocorre de forma fecal-oral. Os primeiros 6 meses de idade é o período de maior risco de contrair a doença; animais nessa faixa etária se tornam alvos fáceis para o Map, pois, durante a amamentação, podem se infectar através de tetos e úberes sujos com fezes de fêmeas infectadas (MEGID, 2016). Outra forma de transmissão é pela via vertical, pois as fêmeas com sinais clínicos da paratuberculose podem passar aos fetos, que já nascem portadores do Map (FISS *et al.*, 2015).

As manifestações clínicas da paratuberculose são mais comuns em animais adultos. Geralmente surgem após 3 anos da infecção, porém o período de incubação pode variar de seis meses a quinze anos. A sintomatologia apresentada por um animal doente é principalmente a diarreia profusa e crônica, além de emagrecimento progressivo e morte, tornando-se vulneráveis ao aparecimento de novas doenças. Animais acometidos pela forma subclínica causam perda econômica para o produtor devido à queda da produtividade e à redução de fertilidade (YAMASAKI *et al.*, 2013).

A doença pode ser diagnosticada através de diagnóstico direto por meio de isolamento da bactéria, em amostras de fezes, leite ou tecidos; também pode ser

realizada baciloscopia e/ou técnicas moleculares. O cultivo microbiológico apresenta alta sensibilidade, porém o tempo para crescimento do agente varia de 6 a 12 semanas. O isolamento do bacilo nas fezes apresenta elevada especificidade, mas a eliminação do agente é afetada de acordo com o estágio (clínico/subclínico) da doença (MEGID, 2016).

Exames de necropsia e histopatológico podem ser empregados. Animais que apresentam parede intestinal espessa ou ondulada semelhantes a circunvoluções cerebrais são considerados suspeitos. A confirmação se dá através da identificação de infiltrados de células epitelioides e macrófagos na lâmina própria, placas de Peyer, vasos linfáticos ou linfonodos regionais, pois essas alterações são consideradas patognomônicas. A imunoistoquímica é outra alternativa de diagnóstico, sendo eficaz em estudos com bovinos de abatedouros, no entanto apresenta reações falso-positivas com certos actinomicetos (MEGID, 2016).

Métodos indiretos também são utilizados, como o teste imunoalérgico e os sorológicos. O teste imunoalérgico é realizado através da inoculação de PPD aviário na tábua do pescoço para verificação de resposta alérgica; é um exame fácil de ser realizado, mas pode resultar em reações falso-positivas devido a micobactérias ambientais. O teste sorológico de fixação de complemento é utilizado como método-padrão, entretanto, devido à sua especificidade relativa, os animais positivos deverão ser confirmados por cultura microbiana. O método de ELISA é indicado para monitoramento do rebanho e, devido à presença de outras micobactérias, pode-

se ter resultados falso-positivos (MEGID, 2016).

A paratuberculose na espécie bubalina foi descrita pela primeira vez no Brasil no estado de Pernambuco. Em estudo realizado por Mota *et al.* (2010), foram coletadas amostras de fezes de 5 animais com sintomatologia similar à da paratuberculose; após realizar esfregaço e coloração através da técnica de Ziehl-Neelsen (ZN), ficou comprovado que os animais estavam infectados.

Objetivou-se com este estudo realizar a investigação da paratuberculose em rebanhos leiteiros de fêmeas bubalinas provenientes da região do Alto Paranaíba e Noroeste de Minas Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CEUA

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), sob o Protocolo n. 13/19.

2.2 LOCAL E ANIMAIS

O estudo foi realizado em 5 rebanhos leiteiros bubalinos dos municípios de Presidente Olegário, São Gonçalo do Abaeté, Campos Altos e Córrego Danta – região do Alto Paranaíba e Noroeste, estado de Minas Gerais. Foram avaliadas búfalas, de diferentes raças e idades, que se encontravam em período de lactação. Os animais foram selecionados aleatoriamente, conforme a disponibilidade do produtor e da fazenda.

Ao todo foram coletadas 54 amostras, sendo que na região Noroeste

foram colhidas amostras de 39 animais de quatro fazendas. Em duas propriedades, a ordenha das fêmeas era realizada diariamente na parte da manhã; nas outras duas, o intuito da criação era voltado principalmente para carne; as fêmeas permitiam ser ordenhadas, porém, por opção dos proprietários, não era realizada todos os dias. Na região do Alto Paranaíba, foram realizadas 15 coletas em uma única propriedade cuja principal atividade era a produção de leite. Nessa fazenda, era realizada a ordenha mecânica nas búfalas, uma vez ao dia no período da manhã. Todos os animais da amostra eram criados em sistema extensivo.

2.3 AMOSTRAS

Para coleta das amostras biológicas, os animais foram contidos em bretes, com cordas e, posteriormente, coletados aproximadamente 5 mL de sangue por meio de punção da veia coccígea, mamária ou jugular, com tubo vacutainer sem anticoagulante, adaptador e agulha 25mm x 0,8mm, estéril. O sangue foi mantido sob refrigeração em caixas de isopor com gelo, em seguida encaminhado para o Laboratório de Doenças Infecciosas do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), onde foi centrifugado a 3.500rpm 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 do exame.

Amostras de fezes foram colhidas diretamente na ampola retal; em seguida, realizado esfregaço em lâminas com auxílio de Swab. As lâminas prontas foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas e realizada a

coloração, através da técnica de Ziehl-Neelsen para identificação dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

As amostras de leite foram colhidas dos 4 tetos mamários da fêmea, excluindo o primeiro jato, sendo colocados diretamente em tubo coletor universal estéril. Após isso, as amostras de leite foram imediatamente acondicionadas em uma caixa de isopor com gelo. No mesmo dia das coletas, o leite foi congelado e retirado apenas no dia de realização do exame.

2.4 TESTES DE DIAGNÓSTICO

Para a detecção de anticorpos anti-Map nas amostras de soro e leite, utilizou-se 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 utilizadas como controles 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. 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 foram realizadas 4 lavagens com solução de lavagem própria do kit. Em seguida, adicionaram-se então 100µL do conjugado HRPO na proporção 1:100, e a placa novamente ficou incubada por 30 minutos. Após isso, realizou-se a remoção do conteúdo líquido e procedida lavagem por 3 vezes. Posteriormente, adicionaram-se 100µL do substrato TMB e a placa foi incubada durante 10 minutos.

Ocorreu parada da reação com a adição de 100µL de solução de interrupção. Os valores de densidade óptica (DO) das amostras e controles foram medidos em espectrofotômetro de placas a 450nm.

O cálculo dos resultados foi determinado pela relação: $100 \times [(Amostra A(450) / CN(DO 450)) / (CP \times CN(DO 450))]$. Para interpretação dos resultados considerou-se os seguintes parâmetros: amostras com relação A/P% $\leq 45\%$ Negativas; $45\% < A/P\% < 55\%$ Suspeitas e $A/P\% \geq 55\%$ Positivas.

2.5 COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

Os esfregaços de fezes foram fixados à chama em bico de Bunsen e, em seguida, cobertos pelo corante fucsina fenicada. Em seguida, realizou-se o aquecimento das lâminas em placa aquecedora até liberar vapores. Após serem lavadas em água corrente, a descoloração foi realizada durante dois minutos, com solução de álcool-ácido. Após isso, o esfregaço foi coberto com o corante azul de metileno por dois minutos. Outra lavagem foi realizada em água corrente e, em seguida, foram secadas em papel filtro. As lâminas foram examinadas no microscópio óptico com objetiva de imersão (100 x) (ZIMMER *et al.*, 1999).

A classificação dos esfregaços em negativos ou positivos foi feita de acordo com a presença ou ausência de BAAR característicos (ADÚRIZ, 1993): negativo - ausência de BAAR compatíveis com Map; 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

Após realização dos exames de ELISA para identificação de anticorpos Anti-Map em amostras de soro sanguíneo e leite, ficou constatado que nenhum animal foi reagente ao teste. Ao analisar as lâminas de esfregaço da mucosa retal dos animais, também não foi identificada a presença de BAAR.

O primeiro relato de paratuberculose foi descrito em uma vaca de 6 anos de idade na Alemanha, no ano de 1895, por Johne e Fronthingan, e atualmente é uma doença considerada de distribuição cosmopolita, e que acomete grandes e pequenos ruminantes. Acredita-se que a infecção esteja presente em 30 a 50% do rebanho de ruminantes do mundo (BRITO *et al.*, 2014). Na Colômbia, o primeiro relato de bubalino positivo foi descrito por Tuberquia *et al.* (2015).

Souza *et al.* (2021) avaliaram a situação epidemiológica da paratuberculose bovina (PTB) em rebanhos leiteiros localizados na região do Alto Paranaíba, Minas Gerais. Amostras sanguíneas de 236 vacas, provenientes de 40 rebanhos, foram avaliadas por meio dos testes de ELISA. A soroprevalência de anticorpos anti-Map foi de 20% para os rebanhos e 6% para os animais. Os fatores de risco associados à doença foram: manejo de bezerros junto com adultos ($p < 0,0001$) e contato dos bezerros com fezes de animais adultos ($p = 0,0258$).

Costa *et al.* (2010) realizaram levantamento através da sorologia (ELISA indireto) em bovinos provenientes de 24 rebanhos do Espírito Santo. Ao todo reuniram 1.450 amostras em 4 mesorregiões do Estado. Após realização dos exames, obtiveram 165

amostras positivas, o que corresponde a 11,4% do total de animais avaliados. Entre as mesorregiões, em duas não foi encontrado nenhum bovino positivo.

Estudos realizados por Medeiros *et al.* (2012), em 734 amostras de caprinos, proveniente de 32 propriedades de 10 municípios do semiárido paraibano, identificaram 330 animais reagentes ao teste sorológico ELISA indireto, com prevalência de 44,96%; em uma das propriedades analisadas não encontraram nenhum caprino positivo.

A paratuberculose ainda tem poucos relatos de casos em búfalos no Brasil. O primeiro foi descrito por Mota *et al.* (2010) no Estado de Pernambuco, onde dos 100 animais da propriedade, 5 apresentavam sintomatologia característica da doença, nestes animais foi realizado esfregaço de fezes e identificado a presença de BAAR. Dois animais foram necropsiados e realizado o raspado da mucosa intestinal e *imprint* de linfonodos, em ambos se obteve resultados positivos.

No Rio Grande do Sul, em estudos realizados por Dalto *et al.* (2012) foram coletadas amostras sanguíneas de 136 búfalos, para realização do teste ELISA indireto a fim de detectar presença de anticorpos anti-Map no soro sanguíneo destes animais. O resultado obtido foi de 21 animais positivos, constatando prevalência de 15,45%. Na propriedade ainda havia 6 animais com sintomatologia compatível a da paratuberculose, os quais também foram incluídos nos exames e todos deram resultado positivo. Segundo relatos do proprietário da fazenda, desde 2004 havia animais com perda de peso progressiva e diarreia crônica.

Brito *et al.* (2016) identificaram rebanhos de bubalinos infectados nos

estados do Maranhão e Alagoas, em propriedades com histórico de animais que apresentavam sintomatologia característica da doença. Entre os fatores de risco da transmissão observados nessas propriedades, os autores citaram o acesso coletivo a áreas de pântanos, bezerros sendo alimentados coletivamente por uma única búfala e o livre comércio de animais na região.

Em estudo realizado por Souza *et al.* (2016), foi detectada a presença de BAAR em amostras de leite de cabras, submetidas ao teste PCR. Ainda não foi relatada a presença em leite de búfalas, porém Albuquerque (2018) identificou Map viável em queijo tipo coalho oriundo de leite de fêmeas bubalinas.

Ainda permanece a suspeita de que Map seja o agente causal da doença de Crohn em humanos. Essa doença é caracterizada por uma enterite inflamatória granulomatosa crônica, nas regiões do jejuno e íleo (MEGID *et al.*, 2016). Alguns autores relacionam as duas doenças, em estudos realizados por Martinho (2012) foi possível a detecção de Map em amostras sanguíneas de pacientes com a doença de Crohn.

A baixa prevalência de búfalos diagnosticados com paratuberculose pode ser explicada ao se comparar a outras espécies, pois os bubalinos são mais resistentes a essa infecção (SIVAKUMAR *et al.*, 2005). Em Minas Gerais, ainda não há estudos publicados sobre a ocorrência da infecção em bubalinos. Em estudo realizado com bovinos, por Carvalho (2008), no município de Viçosa (MG), foram identificados animais positivos. De 204 amostras colhidas para exame ELISA, duas amostras de soro sanguíneo tiveram resultado positivo, e no leite não foram

identificados anticorpos em nenhuma das amostras.

A transmissão da doença através da eliminação do agente por fezes dos bezerros é considerada rara. Porém, em estudo realizado por Wolf *et al.* (2015), pôde-se confirmar a presença do agente em amostras de fezes de bezerros. Caso a

doença tivesse sido diagnosticada neste trabalho, a aglomeração desses animais seria um risco iminente na disseminação da doença. Os fatores predisponentes puderam ser observados em uma propriedade leiteira do município de Córrego Danta (MG), 2019, onde foi realizado o estudo (Figura 1).



Figura 1: Fatores predisponentes: (A) aglomeração de bezerros em curral de manejo; (B) búfala amamentando mais de um bezerro; (C) aglomeração de búfalos adultos em local alagado

Os búfalos não suportam altas temperaturas, em dias mais quentes procuram lugares alagados para se refrescarem dentro da água, isto é um fator de risco muito importante na transmissão do agente, pois, além de ficarem aglomerados, ainda defecam na água, o que facilita a sua veiculação. Outros fatores importantes a serem levados em consideração é o bezerro ao pé da búfala durante a ordenha, pois, esses animais não aceitam serem ordenhados sem a presença do bezerro e há aceitação por parte da fêmea de mais de um bezerro (DALTO *et al.*, 2012).

3 CONCLUSÃO

Na região investigada, não foi observada a ocorrência de anticorpos anti-Map nos rebanhos bubalinos. No Brasil, são poucos os estudos a respeito da doença nessa espécie; em Minas Gerais, ainda não foi relatada a infecção em

búfalos. São necessários, portanto, mais estudos com maior quantidade de animais e de propriedades, para que seja possível estabelecer a real prevalência da infecção no estado.

REFERÊNCIAS

ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. **Exportações e importações**. Disponível em: <https://bufalo.com.br/exportacoes-e-importacoes/>.

ADÚRIZ, J. J. **Epidemiologia, diagnóstico y control de la paratuberculosis ovina en la Comunidad Autónoma del País Vasco**. 1993. Tese (Doutorado), Universidade de Zaragoza, Saragoça - Espanha, 1993.

ALBUQUERQUE, P. P. F. **Ocorrência de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* viável do tipo Cattle**

subtipo Bison em queijo coalho de búfala proveniente de Alagoas, Brasil.

2018. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2018.

BRITO, M. F.; MOTA, R. A.;
YAMASAKI, E. M. **Paratuberculose:**
perguntas e respostas. 2014. Disponível
em:
<http://institucional.ufrj.br/sap/files/2014/12/cartilha-PARATUBERCULOSE-Perguntas-e-Respostas-out-2014.pdf>.

BRITO, M. F.; BELO-REIS, A. S.;
BARBOSA, J. D.; UBIALI, D. G.; PIRES,
A. P. C.; MEDEIROS, E. S.; MELO, R. P.
B.; ALBUQUERQUE, P. P. F.;
YAMASAKI, E.; MOTA, R. A.
Paratuberculosis in buffaloes in
Northeast Brazil. **Tropical Animal
Health and Production**, [S. l.], v. 48, p.
1497-1501, 2016.

CARVALHO, I. A. **Isolamento e
detecção molecular de Mycobacterium
avium subespécie paratuberculosis
(MAP) em rebanhos bovinos leiteiros
na região de Viçosa - MG.** 2008. 72 f.
Dissertação (Mestrado em Medicina
Veterinária), Universidade Federal de
Viçosa, Viçosa, 2008.

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

DALTO, A. G. 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
Johnes' disease in buffaloes. **Tropical
Animal Health and Production**, [S. l.], v.
44, p. 1899-1904, 2012.

FISS, L.; SANTOS, B. L.;
ALBUQUERQUE, P. P. F.; MOTA, R. A.;
MARCOLONGO-PEREIRA, C.;
ADRIEN, M. L.; SOARES, M. P.;
SCHILD, A. L. Paratuberculose em
bovinos de corte na região Sul do Rio
Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária
Brasileira**, Pelotas, v. 5, n. 35, p. 437-442,
maio 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e
Estatística. **Tabela 3939 - efetivo dos
rebanhos, por tipo de rebanho.** 2017.
Disponível em:
<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>.

MARTINHO, A. P. A. **Rastreamento de
Mycobacterium avium subsp.
paratuberculosis na Doença de Crohn.**
2012. 47 f. Dissertação (Mestrado em
Ciências Farmacêuticas), Universidade
Fernando Pessoa, Porto, 2012.

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 semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Patos -
PB, v. 8, n. 32, p. 697-700, ago. 2012.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.
**Doenças infecciosas em animais de
produção e de companhia.** Rio de
Janeiro: ROCA, 2016.

- MOTA, R. A.; PEIXOTO, P. V.; YAMASAKI, E. M.; MEDEIROS, E. S.; COSTA, M. M.; PEIXOTO, R. M.; BRITO, M. F. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Recife, v. 3, n. 30, p. 237-242, mar. 2010.
- PIGNATA, M. C.; FERNANDES, S. A. A.; FERRÃO, S. P. B.; FALEIRO, A. S.; CONCEIÇÃO, D. G. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. **Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 226-233, set. 2014.
- SILVA FILHO, G. B.; CHAVES, H. A. S.; AIRES, L. D'A.; BRAGA, T. C.; RIBEIRO, D. P.; RIZZO, H.; CAMARGO, L. M.; BRITO, L. B.; SANTA ROSA, M. G.; EVENCIO NETO, J.; MENDONÇA, F. S. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em um rebanho de bovinos na Zona da Mata de Pernambuco. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 11, n. 4, p. 247-251, fev. 2018.
- SIVAKUMAR, P.; TRIPATHI, B. N.; SINGH, N. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 108, n. 3-4, jul. 1, p. 263-270. 2005.
- SOUZA, M. C. C.; LIMA, M. C.; BRAGA, I. F. E.; SCHWARZ, D. G. G.; RODRIGUES, A. P. S.; SALES, E. B.; FONSECA JUNIOR, A. A.; MOREIRA, M. A. S. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) isolated from dairy goats in Brazil. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 140, p. 18-21, 2016.
- SOUZA, M. A.; SILVA, B. A.; NASCIMENTO, C. F.; REIS, I. J.; REIS, M. P.; JUNIOR FILHO, H.; AZEVEDO, A. L.; CASTRO, J. R.; LIMA, A. M. C. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and bovine leukemia virus seroprevalence and associated risk factors in dairy herds in Minas Gerais state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 73, n. 2, p. 508-512, mar. 2021.
- TUBERQUIA, B. C.; URIBE, F. M.; RAMIREZ, N. A.; FERNANDEZ, J. Seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y exploración de factores asociados en una población de búfalos del municipio de Gómez Plata, Antioquia. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, [S. l.], v. 28, supl. 105, 2015.
- WOLF, R.; OSEL, K.; DE BUCK, J.; BARKEMA, H.W. Calves shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* are common on infected dairy farms. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 46, p. 71-79, 2015.
- YAMASAKI, E. M.; BRITO, M. F.; MOTA, R. A.; MCINTOSH, D.; TOKARNIA, C. H. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 33, p. 127-140, fev. 2013.
- ZIMMER, K.; DRAGER, K. G.; KLAWONN, W.; HESS, R. G. Contribution to the diagnosis of Johne's Disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen Staining,

Faecal Culture and a commercially available DNA-Probe® Test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces

from cattle. **Journal of Veterinary Medicine - Series B**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 137-140, 1999.