

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA O  
DIAGNÓSTICO DA PARATUBERCULOSE EM FEZES DE  
BOVINOS**

**GILIANE DA SILVA DE SOUZA CABRAL**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE**

**DARCY RIBEIRO - UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ**

**MAIO – 2015**

# **DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA O DIAGNÓSTICO DA PARATUBERCULOSE EM FEZES DE BOVINOS**

**GILIANE DA SILVA DE SOUZA CABRAL**

Tese apresentada ao Centro de Biociências  
e Biotecnologia da Universidade Estadual do  
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como  
parte das exigências para obtenção do título  
de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Elena Lassounskaia

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ

MAIO - 2015

# DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA O DIAGNÓSTICO DA PARATUBERCULOSE EM FEZES DE BOVINOS

GILIANE DA SILVA DE SOUZA CABRAL

Tese apresentada ao Centro de Biociências  
e Biotecnologia da Universidade Estadual do  
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como  
parte das exigências para obtenção do título  
de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 12 de maio de 2015.

Comissão examinadora:

---

*Regina Célia de Souza Campos Fernandes - FMC*

Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias - UFRJ

---

*Ana Bárbara Freitas Rodrigues - UENF*

Doutora em Produção Animal - UENF

---

*Milton Masahiko Kanashiro – UENF*

Doutor em Biociências e Biotecnologia – UENF

---

*ELENA LASSOUNSKAIA - UENF*

Doutora em Ciências Médicas – Ênfase: Imunologia/Alergologia – Rússia

**ORIENTADORA**

## **AGRADECIMENTOS**

❖ Primeiramente a Deus. Pela vida, por seu amor, por sua proteção. Por ter me dado força e oportunidade para chegar até aqui.

❖ Aos meus pais, Matilde e Alcides, por serem meu porto seguro e por terem me incentivado sempre a estudar e que muitas das vezes deixaram de fazer algo para investirem em minha educação profissional.

❖ Ao meu esposo Gustavo, que tem sido meu companheiro e meu verdadeiro amigo, e por ter me aturado nos meus momentos de chatice e por ter me incentivado a chegar até aqui.

❖ Às minhas irmãs, Magna e Alcilane, por todo amor, apoio, pela amizade, incentivo. Amo vocês e os meus lindos sobrinhos Sophia e João Pedro!!!

❖ Ao grupo “elenetes”: Verônica, Marcele, Simone, Fabrício, Thatiana, Andreza, Vinícius, Sanderson, Letícia e Gislane. Um grupo de parceiros e amigos. Obrigada por tudo!

❖ A minha orientadora Elena, pelo carinho, pelo incentivo, pela disponibilidade, pela dedicação, por ter acreditado na minha capacidade e por ter me ensinado os primeiros passos desta nova fase da minha vida.

❖ Aos demais amigos e professores do LBR, Núbia, Rita, Juliana Azevedo, Thatiana, Thais, Andreza, Vinícius, Marlon, Layla, Willian, Bianca, Lívia, Fátia, Rhônia, David, Thaís, Flávia, Alba, Fernando, prof. Jorge, prof. Milton, Prof.<sup>a</sup> Andrea, Prof.<sup>a</sup> Elisângela. Obrigado pela amizade e companherismo!

❖ Aos meus grandes amigos e irmãos: Cristina, Fabrício, David, Antônio, Thais Louvain, Thatiana, Raul, Claudinha, pelos momentos de alegria, tristeza, ansiedade, desespero e sinceridade; pelas longas conversas, pelo aprendizado e pela paciência. Sem vocês, esses anos não teriam sido tão felizes, e seria muito mais difícil

prosseguir. E a todos os companheiros de turma, pelos bons e inesquecíveis anos de convívio.

❖ Ao professor Eulógio, por te me ajudado e ensinado, todos esses anos a trabalhar com Imunohistoquímica. Muito obrigada professor!!!!!!!!!!

❖ À querida Ana Bárbara, pelo incentivo e por estar sempre disposta a ajudar e por ter cedido suas amostras que foram valiosas durante todo meu trabalho com Paratuberculose.

❖ Aos amigos do Laboratório de Sanidade Animal Ricardo Guerreiro, Luciano, Luciana por toda ajuda e pelos bons momentos de convívio.

❖ Aos professores, Milton, Ana Bárbara e Dra.Regina Célia por terem aceitado participar da banca.

❖ A CAPES, CNPQ, UENF/ FAPERJ, pelo apoio financeiro.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	
ÍNDICE DE TABELAS.....	
Resumo.....	
Abstract.....	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Paratuberculose e Doença de Johne.....	3
2.2. Características da patogenia.....	4
2.3. Epidemiologia.....	6
2.4. Características microbiológicas do MAP.....	7
2.5. Infecção humana por MAP e Doença de Crohn.....	8
2.6. Paratuberculose no Brasil.....	9
2.7. Impacto econômico da paratuberculose.....	13
2.8. Programas de controle da paratuberculose.....	14
2.9. Dificuldades no diagnóstico e tratamento da paratuberculose.....	18
2.10. Iniciativas para um diagnóstico preciso da Paratuberculose bovina.....	24
3. JUSTIFICATIVA.....	28
4. OBJETIVO.....	29
4.1 Objetivos Específicos.....	29
5. METODOLOGIA.....	30
5.1. Coleta de material biológico do gado com Paratuberculose.....	30
5.2. Isolamento de IgA nas fezes de animais com Paratuberculose.....	30
5.3. Imunodeteção de antígenos de MAP utilizando IgA isolada de sobrenadante.....	31
5.4. Imunização das Aves e coleta de ovos e soro.....	32
5.4.1. Isolamento de IgY.....	32
5.5. Processamento das amostras para detecção do antígeno APA no	33

sobrenadante fecal.....	
5.6. Imunodeteccção e isolamento do antígeno Apa do sobrenadante fecal por técnica Western blotting, com ou sem imunoprecipitação prévia.....	33
5.6.1 Coloração pelo ácido periódico de <i>Schiff</i>	34
5.7. Imunodeteccção de antígeno APA em sobrenadante fecal através de ELISA sanduíche.....	34
5.8. Sorodiagnóstico.....	35
6. RESULTADOS.....	37
6.1. Isolamento de IgA das fezes de animais com paratuberculose bovina.....	37
6.2. Avaliação da especificidade anti-micobacteciana de IgA em amostras de fezes de animais com Paratuberculose por ELISA.....	38
6.3. Avaliação da especificidade anti-micobacteriana de IgA em amostras de fezes de animais com paratuberculose por <i>Western Blotting</i> .....	40
6.4. Imunodeteccção de antígenos em sobrenadante fecal por anticorpos monoclonais (Mabs) e policlonais.....	42
6.4.1. Produção de anticorpos IgY através de imunização de aves com rAPA MAP.....	42
6.5. Isolamento do antígeno APA do sobrenadante fecal de animais com paratuberculose através de imunoprecipitação.....	45
6.6. Imunodeteccção de antígenos APA em sobrenadante fecal através de ELISA sanduíche.....	47
6.7. Identificação de animais com PTB nos rebanhos da <i>região Noroeste Fluminense</i> através de avaliação clínica, métodos convencionais do diagnóstico laboratorial.....	50
7. DISCUSSÃO.....	56
8. CONCLUSÃO.....	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Isolamento de Imunoglobulinas das fezes de animais com PTB, suspeito e sadio.....	38
Figura 2. Verificação da especificidade anti-micobacteriana de IgA no sobrenadante fecal através de ELISA.....	40
Figura 3. Imunodeteção de IgA específica no sobrenadante fecal por Western blotting.....	41
Figura 4. Titulação dos anticorpos IgY produzidos.....	42
Figura 5. Imunodeteção de antígenos em sobrenadante fecal de bovinos PTB1 e PTB2 através de ELISA indireto utilizando Mabs e soros policlonais produzidos.....	45
Figura 6. Isolamento da proteína APA-MAP secretada nas fezes de bovinos com PTB através de imunoprecipitação.....	46
Figura 7. Imunodeteção do antígeno APA-MAP e sobrenadante de fezes de bovinos com PTB, suspeitos e sadios, através de ELISA sanduíche.....	48
Figura 8. Imunodeteção do antígeno APA-MAP em sobrenadante fecal de bovinos com PTB suspeitos e sadios através de Western blotting.....	49
Figura 9. Confirmação da glicosilação do antígeno APA-MAP em sobrenadante fecal através do reagente de Shiff.....	50
Figura 10. Reconhecimento de antígenos micobacterianos por soros de bovinos através de ELISA indireto.....	51
Figura 11. Imunodeteção do antígeno APA-MAP em sobrenadante fecal de bovinos suspeitos em PTB através de Western blotting.....	52
Figura 12. Imunodeteção do antígeno APA-MAP em sobrenadante de fezes de bovinos suspeitos PTB, através de ELISA sanduíche....	53
Figura 13. Detecção de anticorpos anti-MAP em soros de bovinos suspeitos de PTB (sorodiagnóstico).....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição da ocorrência de PTB em diferentes estados.....	11
--	----



## Resumo

A pecuária bovina é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro. A paratuberculose (PTB) ou doença de Johnes é clinicamente definida como uma infecção intestinal crônica de ruminantes, em especial gado bovino. É caracterizada pela síndrome de má absorção, onde os animais infectados apresentam sinais de diarreia, perda de peso e eventualmente morte. O agente etiológico, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) é eliminado nas fezes e leite de animais infectados, tanto durante a manifestação clínica quanto na fase subclínica de infecção, contaminando outros animais e a pastagem. A doença tem grande importância por causar prejuízos econômicos na pecuária e também há relatos de possível associação de infecção por MAP na doença de Crohn em humanos. No entanto, a importância da doença é subestimada no Brasil, devido à falta de métodos de diagnóstico rápidos, baratos e de alta sensibilidade e especificidade. Novas abordagens para imunodiagnóstico baseadas na detecção e identificação de antígenos de bactéria ou sIgA em fezes podem ser úteis para diagnóstico. Um dos antígenos ativamente secretado por MAP que pode ser utilizado como alvo de detecção é a proteína APA. Para imunodetecção deste antígeno, produzimos anticorpos monoclonais murinos e IgY de galinha contra proteína APA de MAP (APA-MAP). Utilizando estes anticorpos e testes imunoquímicos, detectamos APA-MAP nas fezes de bovinos com PTB, demonstrando que o APA é um biomarcador fecal da doença. Foi produzido um kit de ELISA sanduiche anti-APA-MAP para imunodiagnóstico rápido da PTB através da imunodetecção do antígeno APA em fezes de animais. Os anticorpos produzidos podem ser utilizados também para isolamento do APA-MAP das fezes através de imunoprecipitação. Foi demonstrado que a proteína APA isolada de fezes encontra-se numa isoforma glicosilada de 60/75 kDa, o que foi confirmado através de coloração com reagente de Schiff. Como um método alternativo para diagnóstico fecal da PTB foi verificada também a possibilidade de detecção de IgA anti-micobacteriana. Os resultados demonstram a presença da IgA nas fezes dos animais com PTB. Entretanto, a IgA isolada apresentou uma reatividade cruzada com antígenos de *M. avium* e *M. bovis*, dificultando a diferenciação de PTB e forma intestinal da tuberculose (TB). Foi concluído, que a imunodetecção do antígeno APA-MAP nas fezes do gado é uma nova e promissora abordagem do diagnóstico da PTB, e as ferramentas e metodologia para novos testes foram desenvolvidos neste trabalho.

**Palavras chaves:** Paratuberculose , antígeno APA, Imunodiagnóstico, Fezes

## Abstract

Cattle raising business is one of the most important sectors of Brazilian agriculture. Paratuberculosis (PTB), clinically known as Johne's disease, is a chronic intestinal infection of ruminants, including the cattle. The disease affects the intestines, leading to malabsorption syndrome, diarrhoea, wasting or loss of body condition, and ultimately death. The causative agent, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is excreted by the infected cows in their milk and stool, both during the clinical disease and subclinical stage of infection, contaminating the environment and infecting other animals. PTB causes great economic losses to livestock, and additionally, the MAP could affect human patients with Crohn's disease. In Brazil, the importance of the disease is underestimated due to the difficulties in detection of infected animals, and lack of reliable, fast and cheap methods of laboratory diagnosis. New diagnostic approaches based on detection and identification of MAP antigens or specific sIgA in the stool of infected animals by antibodies can be useful for diagnosis of PTB. The APA antigen is one of the protein antigens actively secreted by MAP bacteria that can be used as a detection target in feces. For immunodetection of this antigen, we produced murine monoclonal antibodies and chicken IgY against APA protein of MAP (APA-MAP). These antibodies detected the APA-MAP protein in the feces of infected cattle in immunochemical tests, demonstrating that the APA is a fecal biomarker of the disease. In this work, we produced anti-APA-MAP sandwich ELISA kit indicated for rapid immunodiagnostic of PTB in feces. The produced antibodies may be used for the APA-MAP isolation by immunoprecipitation. Analysis of the APA protein, immunoprecipitated from feces, by Western blot and staining with Schiff's reagent demonstrated that the isolated protein was presented by a glycosylated 60-75 kDa isoform. Additionally, we developed an alternative method for the immunodiagnosis of PTB that was based on detection in feces of anti-mycobacterial. The obtained results demonstrated the presence of anti-mycobacterial IgA in the feces of animals with PTB. However, isolated IgA showed cross-reactivity against antigens of *M. avium* and *M. bovis* antigens, that did not allow differentiation of PTB and intestinal form of tuberculosis (TB). It was concluded that immunodetection of the APA-MAP antigen in the feces of cattle is a new and promising approach for the diagnosis of PTB, and tools and methods for new diagnostic tests have been developed in this work.

Keywords: Paratuberculosis, APA antigen, Immunodiagnosis, Feces

## 1. Introdução

A pecuária bovina é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro e conseqüentemente da economia nacional. O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, é o maior exportador de carne bovina, segundo maior produtor de carne e sexto maior produtor de leite (USDA, 2014). Desde 2004, o Brasil é o líder mundial de exportação de carne bovina em mais de 180 países, sendo responsável por um quinto da carne comercializada no mercado internacional, o que gera cerca de US\$ 3 bilhões anuais de receita para o país (MAPA, 2012). 1

A paratuberculose (PTB) é uma importante doença infecciosa que afeta gado bovino, caprino e ovino, incluindo na lista de enfermidades notificáveis, que compreende as doenças transmissíveis de importância sócio-econômica e/ou em saúde-pública, cujo controle é necessário para o comércio internacional de animais e alimentos de origem animal (OIE, 2010). Somado a isso, outro aspecto que justifica a necessidade de estudos mais aprofundados da PTB é a ocorrência de uma ampla fase subclínica que dificulta o diagnóstico, e subestima sua incidência pelos proprietários das fazendas e pelos programas de governo (MORTIER *et al.*, 2014; BEHR & COLLINS, 2010; AYELE *et al.*, 2001).

A PTB é endêmica na maioria dos países nas populações de bovinos provocando perdas econômicas substanciais na produção leiteira, baixa eficiência reprodutiva, abate prematuro e redução do valor da carcaça no abate (DONAT *et al.*, 2014; LOMBARD, 2011; HENDRICK *et al.*, 2005, OTT *et al.*, 1999). Por isso, a PTB é considerada uma potencial ameaça à indústria animal devido à sua natureza insidiosa (OIE, 2012) e sua negligência na fase inicial da contaminação do rebanho por MAP, quando a maioria dos animais não apresenta sinais da doença, pode custar caro no futuro. Isso ocorre, pois os animais infectados que se encontram na fase subclínica são capazes de eliminar micobactérias nas fezes e leite, infectando outros animais e contaminando as pastagens (LOMBARD, 2011).

Com leite contaminado, a micobactéria pode ser transmitida para o ser humano também. Apesar da falta de comprovação sobre o papel direto do MAP

na etiologia das doenças humanas, existem relatos sobre a possível participação dessa bactéria na ileocolite granulomatosa que afeta seres humanos, conhecida como doença de Crohn (NASER *et al.*, 2014; OKURA *et al.* 2012; PRADHAN *et al.*, 2011, CROHN *et al.* 1932).

O MAP pode permanecer viável no leite distribuído no varejo, mesmo após o processo de pasteurização industrial HTST (High Temperature and Short Time (72°C/15 s) (FARIA *et al.*, 2014; NASER *et al.*, 2014; GRANT *et al.*, 1996). A imagem da indústria de laticínios, levando em consideração o desejo dos consumidores na obtenção de produtos saudáveis de vacas sadias, pode ser ameaçada pela PTB. De forma preocupante, não há programa de controle e prevenção da PTB nos rebanhos leiteiros brasileiros.

A PTB é uma enfermidade de difícil controle, especialmente pela dificuldade de métodos de diagnóstico capazes de detectar a doença no seu período inicial. Além disso, o longo período de incubação e a ausência de sinais clínicos no estágio inicial da doença favorecem a disseminação da referida enfermidade através das fezes, até mesmo de animais assintomáticos. (LOMBARD, 2011; AYELE *et al.*, 2001). Todos estes fatores aumentam a necessidade da elaboração de estratégias eficazes e economicamente atraentes para o diagnóstico da PTB principalmente no Brasil. Sendo assim, esse trabalho visa implementar métodos de diagnósticos imunoquímicos através da detecção de IgA específica e de antígenos APA-MAP nas fezes de bovinos doentes para o diagnóstico da PTB.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. Paratuberculose e Doença de Johne

*Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) é o agente causador da Paratuberculose (PTB) de ruminantes, que na sua fase clínica é conhecida como doença de Johne (JD) (LOMBARD, 2011; WHITTINGTON *et al.*, 2012). Esta doença representa um grande desafio para a Medicina Veterinária, pois a infecção é crônica de desenvolvimento lento, contagiosa e fatal nas etapas avançadas. Atualmente a PTB é endêmica nas populações de bovinos de muitos países incluindo: Austrália, Canadá, Dinamarca, Estados Unidos (GERAGHTY *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2013; NIELSEN and TOFT, 2009, AYELE *et al.*, 2001).

Apesar da maioria das informações sobre PTB vir de gado bovino leiteiro, é importante considerar que a doença afeta também outras espécies de mamíferos, como: ovinos, caprinos, veados, camelídeos, ruminantes selvagens e exóticos (WHITTINGTON *et al.*, 2012; BENNETT *et al.*, 2012; ROSSEELS and HUYGEN, 2008; KHAN *et al.*, 2010). A PTB também tem sido registrada em uma variedade de espécies não ruminantes, incluindo coelhos, cavalos, burros, cães, gatos, porcos e primatas não-humanos (STEVENSON *et al.*, 2009; BEARD *et al.*, 2001; GLANEMANN *et al.*, 2008; STIEF *et al.*, 2012; GREIG *et al.*, 1999).

A síndrome clínica da infecção crônica intestinal foi reconhecida no início de 1800, quando foi inicialmente pensado ser uma forma intestinal de tuberculose. Somente em 1895, na Alemanha, que Johne e Frothingham demonstraram a presença de *Mycobacterium paratuberculosis* no intestino dos bovinos e descreveram uma nova doença, nomeada doença de Johne (JOHNE and FROTHINGHAM, 1895). Em 1910, o micro-organismo foi isolado e foi demonstrada sua capacidade de reproduzir experimentalmente a doença no gado (HERMON-TAYLOR, 2000). O agente causador sofreu reclassificação taxonômica e mudanças de nome ao longo dos anos, até que em 1990, foi feita uma proposta para alterar o nome do agente de *Mycobacterium paratuberculosis* para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* pela sua estreita relação genética com *M. avium* (CHIODINI *et al.*, 1984).

Até o início dos anos 1900, a PTB havia sido encontrada em vários países europeus e nos Estados Unidos. Desde então, ela se espalhou por todo o mundo e agora é encontrada em praticamente todos os países onde existe indústria pecuária se tornando um problema mundial (SINGH *et al.*, 2013; NIELSEN and TOFT, 2009; KENNEDY and BENEDICTUS, 2001; CHIODINI *et al.*, 1984).

## 2.2. Característica da patogenia

Na maioria das vezes a infecção por MAP acontece através da via fecal-oral (BEGG & WHITTINGTON, 2008; MERKAL, 1984; CHIODINI *et al.*, 1984). Do lúmen intestinal, as micobactérias são absorvidas pelas células M (*microfol cells*), localizadas no epitélio-associado aos folículos de placas de Peyer e folículos linfóides isolados (ILFs), quando entra em contato com macrófagos e células dendríticas (DC) na região subepitelial da lamina própria (MOWAT AM, AGACE WW, 2014). Em macrófagos, MAP inicia ciclos da sua reprodução, e as células dendríticas infectadas migram para os linfonodos intestinais e induzem a resposta imune adaptativa através da apresentação dos antígenos micobacterianos aos linfócitos. Os linfócitos T e B ativados, monócitos e neutrófilos são recrutados ao local de infecção inicial formando granulomas destinados a contenção de micobactérias. O sistema imune é capaz de controlar a infecção, inibindo a multiplicação da bactéria, o que corresponde a uma longa fase subclínica, por dois a cinco anos, sem eliminação do microorganismo nas fezes ou com eliminação intermitente (CHIODINI *et al.*, 1984; LILEMBAUN *et al.*, 2007). Nos ruminantes, o foco da patologia da doença é a junção ileocecal e da região do jejuno. O período subclínico é inversamente relacionado com a dose de infecção, ou seja, quanto mais MAP ingerido mais curto será período de tempo para exibir sinais clínicos (LOMBARD, 2011).

A inflamação induzida na mucosa intestinal por MAP provoca o espessamento da parede intestinal do animal, o que leva á redução da capacidade de absorção do intestino e enteropatia com perda de proteínas (CLIQUEIRE *et al.*, 2010). A infecção por MAP possui também um efeito

neuropatogênico especialmente para os neurônios não-mielinizados do intestino provocando neuropatia crônica entérica com perda de integridade da mucosa. As alterações na resposta neuroimune do intestino facilitam a penetração de patógenos secundários do lúmen para a parede do intestino. Estes incluem vários organismos da microbiota entérica, os micróbios saprofitos e oportunistas, mais agressivos, como *E. coli* (SCANU *et al.*, 2007).

O desenvolvimento da enterite crônica granulomatosa degenerativa causa diarreia intermitente persistente, perda de peso progressiva, e eventual morte (CHIODINI *et al.*, 1984; STREETER *et al.*, 1995). De acordo com a severidade dos sinais clínicos, a PTB bovina progride em quatro etapas: 1) fase silenciosa, em que MAP não é detectado nas fezes; 2) fase subclínica, quando MAP pode ser excretado nas fezes, embora os sinais clínicos da doença não sejam identificados pelos métodos de diagnóstico. O gado pode permanecer nestes estágios, sem desenvolver a doença clínica ou pode progredir para estágio clínico, tipicamente após pelo menos 2 anos de infecção; 3) fase clínica, onde o animal apresenta sinais da doença evidentes como perda de peso e diarreia; e 4) fase avançada, onde os animais apresentam sinais clínicos avançados da doença, incluindo letargia, emagrecimento e diarreia profusa podendo levar o animal a morte. (MERKAL *et al.*, 1968; WHITLOCK and BUERGELT 1996; GILARDONI *et al.*, 2012).

Vale ressaltar, que alguns animais infectados podem não apresentar sinais clínicos durante a sua vida produtiva. Uma das dificuldades em controlar a infecção por MAP é que os animais frequentemente eliminam a bactéria nas fezes antes de mostrar quaisquer sinais clínicos, assim, insidiosamente contribuindo para disseminação da infecção (LOMBARD, 2011).

### **2.3. Epidemiologia**

A propagação da infecção da PTB entre rebanhos é principalmente devido à circulação na compra e venda de gado infectado, e dentro do rebanho, a transmissão ocorre mais frequentemente através do contato dos animais suscetíveis com fezes de bovinos infectados (LOMBARD 2011). Outras vias de transmissão da infecção são vertical através da placenta para o feto

(SEITZ *et al.*, 1989, NIELSEN *et al.*, 1992, OIE, 2010; LAMBERTH *et al.*, 2004; WHITTINGTON & WINDSOR, 2009) e com sêmen (SWEENEY, 1996; BUERGELT *et al.*, 2004; AYELE *et al.*, 2001). Segundo Streeter *et al* (1995), as vacas com PTB também podem excretar MAP diretamente no leite ou colostro, por isso o consumo desses alimentos por bezerros também pode resultar em infecção.

Geralmente, os animais jovens nos primeiros meses de vida são os mais suscetíveis à infecção devido a um aumento da permeabilidade do intestino nas primeiras 24 horas de vida e o sistema imune imaturo (LARSEN *et al.*, 1975; WHITTINGTON, 2010; LOMBARD, 2011, THAKUR *et al.*, 2013). Eles são infectados através de ingestão oral dos microrganismos a partir de tetas, alimentos ou água contaminada e pelo contato com fezes de animais adultos. (SWEENEY *et al.*, 1992; COCITO *et al.*, 1994; WHITTINGTON, 2012).

No entanto, condições de estresse, como parto e deficiência nutricional, podem desencadear o aparecimento dos sinais clínicos da doença nos animais adultos. A doença é muito mais frequente em animais confinados, devido a uma maior contaminação do ambiente através das fezes (AYELE *et al.*, 2001). Apesar da eliminação de quantidades mínimas de MAP nas fezes dos animais durante a fase subclínica, ao longo do tempo, esta eliminação pode levar a uma contaminação significativa do ambiente e uma insidiosa propagação da infecção em todo o rebanho. Durante a fase clínica da infecção, excreção fecal do micro-organismo é bastante elevada e pode exceder  $10^{10}$  organismos/g de fezes (CHIODINI *et al.*, 1984).

Segundo Paolicchi e Romano (2012), a probabilidade de infecção diminui à medida que a idade avança, sendo que adultos são menos suscetíveis, embora não isentos de contágio, dependendo da carga bacteriana ao qual estão expostos.



## 2.4. Características microbiológicas do MAP

Como todas micobactérias, MAP é uma bactéria intracelular facultativa, com morfologia de um bastonete pequeno de aproximadamente 0,5 x 1,5mm, Gram positiva, imóvel, não esporulada, aeróbica e fortemente álcool-ácido-resistente – BAAR (Bacilo álcool-ácido resistente) (CASTRO & TRABULSI, 1999; GWOZDZ, 2010; AYELE *et al.*, 2001). É um microrganismo bastante fastidioso, seu isolamento e cultivo em meios de cultura é tarefa trabalhosa e demorada. Quando crescido em meios artificiais como "Herrold Egg Yolk Médium" (HEYM), "Reid -Watson" ou "LowensteinJensen" (LJ), formam colônias rugosas despigmentadas, de crescimento lento, em torno de 8 a 16 semanas. (TAYLOR, 1981; BARCLAY *et al.*,1985; GOMES, 2002). Uma característica clássica de MAP é seu crescimento dependente de micobactina, um aditivo nutricional à base de complexos solúveis de ferro, que permite o crescimento do microrganismo fora do hospedeiro, ou seja, em meios de culturas (BARCLAY *et al.*,1985; LAMBRECHT & COLLINS, 1992). O ferro é um elemento essencial para a maioria das bactérias, sua disponibilidade e o seu sequestro estão associados com a sobrevivência e com a virulência bacteriana. Diferentemente das outras micobactérias, MAP é incapaz de produzir micobactina, o que o torna incapaz de sequestrar o ferro fora do hospedeiro (COCITO *et al.*, 1994).

## 2.5. Infecção humana por MAP e Doença de Crohn

Apesar da bactéria não crescer fora do hospedeiro, ela pode permanecer no leite ou no meio ambiente por até um ano sob condições favoráveis como o solo úmido (BERGHAUS *et al.*,2006). MAP é resistente a vários fatores físicos, incluindo temperaturas elevadas comumente utilizadas na pasteurização de leite (RAIZMAN *et al.*, 2011; SHANKAR *et al.*, 2010; BARKEMA *et al.*, 2010; SWEENEY, 1996, CHIODINI *et al.*, 1984)

A presença de DNA de MAP foi demonstrada em 6,5% das amostras de leite integral pasteurizado e micobactérias viáveis foram também isoladas a partir de algumas destas amostras (SHANKAR *et al.*, 2010; ELLINGSON *et al.*,

2005). Sendo assim, o MAP pode ser transmitido aos seres humanos por consumo de leite cru ou pasteurizado e, possivelmente, por outros produtos lácteos (queijo, ricota), uma vez que estudos já demonstraram a presença de células viáveis nestes produtos (FARIAS *et al.*, 2014; OKURA *et al.*, 2012; WADDEL *et al.*, 2008; ELLINGSON *et al.*, 2005).

A presença de MAP foi detectada no intestino de 0,8% dos pacientes com diferentes doenças intestinais, e a proporção aumenta significativamente, até 30%, em pacientes com doença de Crohn (SECHI *et al.*, 2005). A doença de Crohn é uma ileocolite granulomatosa crônica de seres humanos, de etiologia desconhecida, que geralmente acomete pacientes jovens (Chiodini, 1989). Vários relatos permitem associar a infecção por MAP e a Doença de Crohn (CROHN *et al.*, 1932, HERMON-TAYLOR 2001, GRANT, 2005, OKURA *et al.*, 2012). A histopatologia da doença de Crohn é parecida com a patologia observada no gado com PTB. Além disso, resposta sorológica contra MAP foi detectada em pacientes com doença de Crohn (NAKASE *et al.*, 2006; JUSTE *et al.*, 2009).

Recentes estudos revelam alta frequência de bacteremia confirmada pelas hemoculturas positivas para MAP em 50-55% dos pacientes com doença de Crohn (NASER *et al.*, 2004). Ainda maior (até 60%) é o nível de detecção de DNA da micobactéria no tecido intestinal, linfonodos mesentéricos e sangue dos pacientes em comparação com amostras de controles não associados à doença de Crohn (AUTSCHBACH *et al.*, 2005). Estes resultados estabelecem o papel de MAP como um microorganismo invasor frequentemente associado à doença de Crohn e a necessidade do tratamento anti-micobacteriano pelo menos dos pacientes com bacteriemia está em discussão (revisado por AGRAWAL *et al.*, 2014). No entanto, o papel de MAP na etiologia da doença de Crohn não foi definida (KRUININGEN, 1999; LOWE *et al.*, 2008).

A relevância da PTB em se tratando de saúde pública e seu possível potencial zoonótico na doença de Crohn em pacientes humanos deve ser estudado melhor (WADDEL *et al.*, 2008). Ainda há muitas questões em aberto referentes à epidemiologia e patogenicidade de MAP para seres humanos, que devem ser respondidos com urgência para elaborar uma avaliação dos riscos associados com PTB e MAP (revisado ATREYA *et al.*, 2014; AGRAWAL *et al.*,

2014). Sendo assim, está claro que o controle da PTB bovina, a prevenção da contaminação do leite e a transmissão do MAP para seres humanos é um desafio atual.

## 2.6. Paratuberculose no Brasil

No Brasil, a PTB foi diagnosticada pela primeira vez em bovinos da raça Flamengo importados da Bélgica, no Posto Zootécnico Federal, em Pinheiro, Rio de Janeiro. O fato foi divulgado sob a forma de nota no Jornal do Comércio do Rio de Janeiro (DUPONT, 1915). Em 1956, Santos & Silva relataram um caso da doença de Johne em um touro da raça Holandesa com seis anos de idade proveniente de uma fazenda situada no Município de Barra Mansa, no Estado do Rio de Janeiro (SANTOS & SILVA, 1956). O próximo registro foi realizado por Dacorso Filho *et al.* (1960) que diagnosticaram a PTB, realizando exames clínicos e patológicos em dois animais da raça Jersey provenientes de um mesmo rebanho com histórico da enfermidade, no Município de Petrópolis, RJ, posteriormente, com a implementação de métodos de diagnóstico laboratorial (bacteriológicos, imunológicos e moleculares), um maior número de trabalhos de detecção dos casos de PTB em diferentes regiões do Brasil foram publicados (Tabela 1).

A incidência da PTB no gado avaliado variou muito, de 2% até 65% dos animais positivos. Tais resultados dependem dos métodos de diagnóstico utilizados em cada região geográfica específica. Os animais com PTB foram encontrados em vários estados do país. Em geral, o número de animais soropositivos detectados por ELISA (de 11% até 65%) foi maior que número dos casos confirmados pelo isolamento das culturas de MAP (de 2,3% até 12,8%). Somente seis trabalhos de detecção de MAP em tecidos, fezes ou leite por PCR foram publicados (JUSTIANO, 2012; CARVALHO *et al.*, 2012; DALTO *et al.*, 2012; RODRIGUES, 2005; YAMASAKI *et al.*, 2010; MOTA *et al.*, 2010), com variação das amostras positivas entre 2,5-20%. Análise destes resultados e a conclusão sobre a incidência da PTB no Brasil devem ser tomadas com cautela, uma vez que deve ser considerada a variabilidade na especificidade e

sensibilidade dos diferentes métodos que deve ser considerada, assim como as dificuldades das técnicas de diagnóstico da PTB (YAMASAKI *et al.*, 2013).

**Tabela 1.** Distribuição da ocorrência de PTB em diferentes estados brasileiros.

Região estudo	Animal	Leiteiro/ Corte	Técnica Utilizada	Material	Prevalência	Referência
Rio de Janeiro	Bovino	Corte	-	-	--	Dupont, 1915
Rio de Janeiro	Bovino	Corte	Exames clínicos e anatomo-histopatológico	Intestino	1 bovino	Santos & Silva, 1956
Rio de Janeiro	Bovino	Corte	exames clínicos e patológicos	Intestino	3 bovinos	Dacorso filho et al., 1960
Rio de Janeiro	Bovino	Corte	Exames necroscópico e bacteriológico	Fezes, intestino e linfonodos	1 bovino	Silva & Pizelli, 1960
Santa Catarina	Bovino (touro)	Corte	PPD, exames clínicos e patológicos e cultura	Intestino, Linfonodo	2 bovinos	Portugal et al., 1979
Rio Grande do Sul	Bovino (Touro)		PPD, exames clínicos e anatomo-histopatológico e cultura	Intestino Fezes	1 bovino	Ramos et al., 1986
Minas Gerais	Bovino	-	PPD, Zieh- Neelsen, exames clínicos e patológicos e cultura	Fragmentos intestinais	1 bovino	Nakajima et al., 1991
Rio Grande do Sul	Caprino	-	infecção experimental em caprinos, PPD, exames anatomo-histopatológico	Intestino	66% (3)	Poester & Ramos, 1994
São Paulo	Bovino	Leiteiro	ELISA	Soro	65% (40)	Rivieira, 1996
Mato Grosso do Sul	Bovino	Corte	ELISA	Soro	45,5% (635)	Rivieira, 1996
Rio Grande do Sul	Bovino	Leiteiro	Exames clínicos, anatomo-histopatológico e cultura	Intestino, linfonodos	2,31% (345)	Driemeier et al., 1999
São Paulo	Bovino	Leiteiro	ELISA	Soro	37,9% (403)	Fonseca et al., 2000
Rio de Janeiro	Bovino	Leiteiro	ELISA	Soro	18% (1004)	Ferreira et al., 2001
Rio Grande do Sul	Bovino	Leiteiro	ELISA, IDGA e Cultura	Soro	39,8% (125)	Gomes et al., 2002
Paraíba	Bovino	Leiteiro	Cultura	Fezes	1,25% (160)	Dias et al., 2002
Goiás	Bovino	Corte	Exames clínicos e anatomo-histopatológico	Intestino	-	Cunha et al., 2003
Rio de	Bovino	Leiteiro	IDGA	Soro	29,17%	Ferreira et al.,

Janeiro					(48)	2002
Pará	Bovino	Corte	ELISA	Soro	35,4% (514)	Silva ,2005
Goiânia	Bovino	Leiteiro	ELISA	Soro	60,24% (166)	Acyprest et al., 2005
Rio de Janeiro	Bovino	Leiteiro	PCR, cultura, imunohistoquímica, Exames clínicos e anatomo-histopatológico	Intestino; Linfonodo mesentérico	4 casos (340)	Rodrigues,2005
Rio de Janeiro	Bovino	Leiteiro	ELISA, cultivo bacteriano e histopatologia	Soro	12,8 % (133)	Ristow et al., 2007
Pernambuco	Bovino	Leiteiro	ELISA	Soro	32,3% (55)	Mota et al., 2007
Minas Gerais	Bovino	Leiteiro	Cultura, ELISA, PCR	Fezes,Leite	3,6% (200)	Carvalho,2008
Paraíba	Bovino	Leiteiro	Exames clínicos e Zieh-Nielsen, anátomo-histopatológicos e cultura, Elisa	Intestino, Fezes, Soro	2 casos (160)	Mota et al.,2009
Paraíba	Ovino e Caprino	-	PPD, Exames clínicos, anatomo-histopatológico imunohistoquímica	válvula ileocecal e linfonodos mesentéricos	25,4% (200)	Oliveira et al., 2010
Rio de Janeiro	Bovino	Leiteiro	ELISA, PCR	Soro	40% (298)	Yamasaki et al., 2010
Espírito Santo	Bovino	Leiteiro	ELISA	Soro	11,4% (1450)	Costa et al.,2010
Paraíba	Bovino	Leiteiro	ELISA	Soro	10,8% (486)	Medeiros et al., 2012b
Minas Gerais	Bovino	Leiteiro	PCR IS900, clonagem e sequenciamento genético	Leite	3,8% (206)	Carvalho et al., 2012
Rio Grande do Sul	Bubalino	-	ELISA, cultura, exames clínicos e anátomo-histopatológicos, imunohistoquímica, PCR	Fezes, ileo, e linfonodos mesentéricos	20% (203)	Dalto et al.,2012
Paraíba	Caprino Ovino	-	Exames histopatológicos, Zieh-Nielsen e PCR	linfonodos mesentéricos e válvula íleocacal	12,16% (74 caprinos) 15,6% (77 ovinos)	Justiano, 2012
Pernambuco	Bovino	Leiteiro	ELISA	Soro	2,7% (408)	Sá &Pinheiro Junior, 2013
Paraíba	Caprino	-	ELISA	Soro	(0,82%) 727	Freitas et al., 2015

## 2.7. Impacto econômico da paratuberculose

Tem sido um grande desafio calcular as perdas para a indústria de laticínios associados à infecção subclínica MAP, devido à grande dificuldade em identificar portadores subclínicos e avaliar o impacto da infecção na produtividade destes animais (HASONOVA & PAVLIK, 2006; JOHNSON-IFEARULUNDU & KANEENE, 1997).

O impacto econômico da PTB no gado leiteiro tem sido o foco de muitos estudos (HASONOVA & PAVLIK, 2006). Perdas econômicas estão associadas ao descarte prematuro dos animais (BENEDICTUS *et al.*, 1987; JOHNSON-IFEARULUNDU *et al.*, 2000; HENDRICK *et al.*, 2005); redução da fertilidade (JOHNSON-IFEARULUNDU *et al.*, 2000); e redução da produtividade leiteira (RAIZMAN *et al.*, 2007; RAIZMAN *et al.*, 2009). E também com os custos indiretos relativos à mão-de-obra, dieta, despesas com veterinários, despesas com testes de diagnóstico, despesas com medicamentos; despesas com programas de controle (OTT *et al.*, 1999; OTTE & CHILONDA, 2000)

Segundo McKenna *et al.* (2006) essas perdas têm uma computação ainda maior em animais subclínicos e redução da eficiência reprodutiva, eficiência alimentar, e diminuição na produção de leite. As perdas associadas com PTB subclínica, animais infectados sem sinais clínicos aparentes, têm sido mais difíceis de quantificar por causa da dificuldade em detectar com precisão por meio dos testes de diagnósticos disponíveis atualmente. Esses estudos são feitos geralmente por teste de ELISA, através da detecção da resposta imune no organismo, uma vez, que o cultivo fecal tem custo elevado e longo tempo para obter os resultados das amostras.

No Brasil existe uma carência sobre a doença e sobre os impactos econômicos por ela produzidos nos rebanhos, não existindo ainda nenhum estudo publicado sobre impacto da PTB (GOMES, 2002), uma vez que a doença tem um longo período de incubação, e os sinais clínicos tipicamente só aparecem depois de dois a cinco anos e vem causando prejuízo em vários países.

Nos EUA, onde a doença possui elevada importância econômica porque provoca altos prejuízos, relacionados principalmente a rebanhos leiteiros (OTT *et al.*, 1999). Segundo Abbas *et al.* (2011), estima-se que a prevalência da infecção por MAP em rebanhos leiteiros nos EUA varie de 20 a 40% e os custos para a indústria de laticínios são estimados em 220 a 250 milhões de dólares por ano, devido à perda da reprodutividade, ao aumento dos custos de reposição de vaca e à redução da produção de leite e diminuição da fertilidade.

Um estudo realizado por Chi *et al.* (2002), no Canadá, estimou os custos anuais da PTB comparado com outras três doenças: diarreia viral bovina (BVD), leucose enzoótica bovina (EBL) e neosporose. A PTB teve o maior custo estimado em CD\$ 2472 por rebanho infectado, utilizando um tamanho médio do rebanho de 50 vacas.

Segundo Paliochi *et al.* (2003), na Argentina as perdas econômicas são estimadas em 22,0 milhões de dólares para a criação de gado e 6,3 milhões de dólares para o gado leiteiro na área pecuária a criação da província de Buenos Aires.

No Brasil, essas perdas econômicas podem ser ainda maiores como detentor do segundo maior rebanho do mundo e com relatos da PTB em bovinos em quase todo território nacional. Entretanto, existe uma carência de informação sobre a doença e sobre os impactos econômicos por ela produzidos nos rebanhos, não existindo ainda nenhum estudo publicado sobre impacto da PTB.

## **2.8. Programas de controle da paratuberculose**

O controle e erradicação da PTB é uma tarefa complicada devido à: 1) seu longo período de incubação e ausência de sinais clínicos nos estágios iniciais da doença, período em que os animais infectados podem ser disseminadores da enfermidade, através das fezes mesmo sem apresentarem doença; 2) falta de métodos laboratoriais sensíveis e específicos que permitem diagnosticar o animal principalmente nas fases iniciais da doença (SOHAL *et*

*al.*, 2015; RADHIKA *et al.*, 2014); 3) falta de métodos eficazes para o tratamento e prevenção (FACCIUOLO *et al.*, 2013). Tudo indica que sem novos métodos de diagnóstico a erradicação da doença é uma meta irreal. Por enquanto, todos os esforços devem ser direcionados na elaboração de medidas de controle da infecção, efetivas e economicamente justificadas, que devem ser utilizadas como base para geração dos programas de controle da PTB (GROENENDAAL & GALLIGAN, 2014).

Segundo Greig *et al.*(1999) um programa de controle da PTB efetivo dependerá de um claro entendimento das fontes de infecção, vias de transmissão da doença e a rápida detecção de animais infectados, permitindo assim a remoção de indivíduos portadores do rebanho. Antes de estabelecer a prevenção e o programa de controle da PTB, uma avaliação sistemática da ocorrência e a prevalência da doença em um determinado rebanho, ou região são essenciais (AYELE *et al.*,2001; KENNEDY & BENEDICTUS, 2001).

Na maioria dos países desenvolvidos, os programas de controle e prevenção da PTB foram implementados durante as três últimas décadas. Os programas têm variado dependendo da especialidade da produção pecuária, do ambiente de agronegócio e se os órgãos governamentais ou indústria pecuária têm sido os principais motores da implementação do programa. Maioria desses países (EUA, Canadá, Austrália, Noruega, França, Islândia, Japão, Holanda, Dinamarca, Gre-Bretânia) optaram por programas voluntários de controle (revisado por GERAGHT *et al.*, 2014). E as estratégias principais incluem, geralmente, um ou mais dos seguintes objetivos:

- Melhoramento do conhecimento e compreensão da PTB por produtores e desenvolvimento de ferramentas para melhor gestão da infecção MAP;
- Prevenção e controle dos efeitos da doença de Johne no bem-estar dos animais e na produtividade da indústria agropecuária;
- Avaliação do status de gado e rebanhos de reprodução em relação da PTB através de testes diagnósticos e identificação/certificação dos rebanhos de baixo e de alto risco;



- Redução da ocorrência de PTB em rebanhos e regiões infectados e de introdução de animais com PTB em rebanhos não infectados (atividades de bio-exclusão) e prevenção da sua disseminação para áreas não afetadas (bio-contenção);
- Gestão dos riscos associados à contaminação de produtos alimentares por MAP.

A principal medida direcionada na redução de disseminação da infecção (bio-contenção) se baseia atualmente em teste-e-abate dos animais doentes, sendo que as tentativas de vacinação para prevenção de infecção no gado bovino não foram eficazes (BASTIDA & JUSTE, 2011; CHO *et al.*, 2012; AL-GHAMDI, 2013; KHOL & BAUMGARTNER, 2012; BENNETT *et al.*, 2012).

Apesar de ter sido bem sucedida a nível agrícola, essa estratégia apresenta custo econômico elevado, pois a falta de sustentabilidade dos testes diagnósticos repetidos e abate contínuo de animais no início da sua vida produtiva dificultam a aceitação generalizada dessas medidas para o uso em uma escala mais ampla em países mais pobres e pelos produtores de médio e pequeno porte.

Por razões econômicas, nos países em desenvolvimento, que incluem grandes produtores de carne e leite, como Brasil, Índia e Argentina, os programas de controle da PTB não foram implementados ainda.

No Brasil, o primeiro passo direcionado no monitoramento da situação epidemiológica em relação da doença de Johne foi feito a partir de 2013. O Ministério de agricultura, pecuária e abastecimento incluiu a PTB na lista de doenças de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial (SVO), no grupo de doenças que requerem notificação imediata de qualquer caso confirmado (MAPA, 2013). Próximo passo é o desenvolvimento do programa nacional de controle da PTB adaptado para realidades do país e aplicação das medidas de controle e prevenção da doença sob o controle oficial. Neste sentido, o Brasil encontra-se em situação privilegiada podendo utilizar somente as melhores práticas de controle da PTB de acordo com os resultados de implementação dos programas de controle dos outros países. Não há tempo para cometer todos os erros cometidos na luta sanitária contra a PTB.

Alguns cuidados mínimos de biossegurança devem ser tomados pelos agricultores envolvidos na criação do gado, segundo AHA ( 2012):

- Manter as áreas de maternidade e parto limpo, seco e livre de estrume. A área de maternidade e parto não deve abrigar não parturientes ou animais doentes;
- Certifique-se que gados adicionados ao rebanho venha de apenas fontes de baixo risco devidamente documentados;
- Minimizar a exposição de gado jovem ao estrume de gado adulto;
- Evitar a exposição de gado com bovinos e outras espécies animais suscetíveis que podem ser infecciosos.
- Minimizar a contaminação dos alimentos, água, equipamentos e veículos com esterco.
- Segregar, testar e remover casos clínicos suspeitos do rebanho, o mais rapidamente possível.

Cuidados específicos a serem tomados com rebanho leiteiro:

- separar imediatamente do gado adulto quaisquer bezerros que serão retidos no rebanho ou vendidos para fins de leiteiros.
- Só alimentar bezerros com leite pasteurizado ou de um substituto do leite de qualidade.
- Manter estoque novo livre da exposição ao esterco de gado adulto, mante-los sempre separados por idade.

## 2.9. Dificuldades no diagnóstico e tratamento da paratuberculose

As grandes dificuldades no diagnóstico da PTB estão relacionadas ao caráter crônico da infecção, lento crescimento de bactéria e demora no aparecimento dos sinais clínicos da doença visto que o sistema imune é capaz de controlar infecção durante períodos prolongados de tempo. Todas essas particularidades da patogênese dificultam a detecção precoce do agente causal, MAP, em animais (COLLINS *et al.*, 2006, NIELSEN, 2009; KÄSER *et al.*, 2009).

Os sinais clínicos da PTB, como o emagrecimento dos animais sem perda do apetite, a diarreia intermetente, profusa, homogênea, semifluida ou líquida, não responsiva a tratamentos (JUBB *et al.*, 2007; BEHR & COLLINS, 2010), são inespecíficos e devem ser confirmados por testes laboratoriais.

Os principais métodos de diagnóstico laboratorial atuais baseiam-se a) detecção do agente etiológico em amostras clínicas (cultura de MAP ou detecção BAAR (bacilos álcool - ácidos resistentes) e, pela coloração de Ziehl-Neelsen nas fezes ou tecidos; b) testes sorológicos com detecção da resposta imune humoral do hospedeiro em resposta á infecção; c) detecção da imunidade celular através do teste intradérmico PPD ou teste de IFN- $\gamma$  *in vitro*; d) provas moleculares de detecção de DNA bacteriano por PCR nas fezes, tecidos ou leite (MANNING & COLLINS, 2001; revisado por ROUSSEL *et al.*, 2007).

Todavia, em geral, a maioria destes testes tem baixa sensibilidade em animais jovens ou no início do desenvolvimento da doença, levando aos resultados falso-negativos (MANNING & COLLINS, 2001; STABEL, 1997). Resultados falso-positivos são mais frequentes durante a utilização dos métodos imunológicos, como sorodiagnóstico ou teste PPD, devido a reações cruzadas com outras micobactérias, que o gado pode adquirir do meio ambiente e que também podem induzir a resposta imune (FACCIUOLO *et al.*, 2013; LILENBAUN *et al.*, 2007; MANNING & COLLINS, 2001).

A sensibilidade dos testes laboratoriais aumenta à medida que a doença progride, mesmo antes de os sinais da doença serem perceptíveis (GILARDONI *et al.*, 2012; STABEL, 1997).

O isolamento de MAP das fezes e/ou tecidos é o método de diagnóstico mais definitivo e considerado padrão ouro para o diagnóstico da PTB, apesar de apresentar baixa sensibilidade (varia entre 50% e 70%), quando o isolamento é feito a partir de amostras fecais de bovinos (OIE, 2014; COLLINS *et al.*, 2006; STABEL, 1997). MAP requer condições especiais para o crescimento devido sua dependência a micobactina J e, além disso, levam até 16 semanas para que surjam as primeiras colônias (CHIODINI *et al.*, 1984). A concentração detectável de bacilos nas fezes é alta (limite de detecção pelo menos 100 UFC/g fezes). Isto dificulta a detecção dos animais nas etapas iniciais da infecção, quando a eliminação de bactéria nas fezes ainda não acontece ou está baixa (MANNING & COLLINS, 2001). Uma vez que os animais infectados entram na fase clínica da doença, apenas 15-25% deles podem ser detectados por cultura bacteriana (GILARDONI *et al.*, 2012).

Um grande problema quando se trata do cultivo fecal é a contaminação da cultura por outros micro-organismos fecais sendo que para minimizar esse problema, as amostras são submetidas a processos de descontaminação para reduzir significativamente a quantidade de fungos e bactérias, o que leva aos erros de amostragem relacionados à seleção dos espécimes, e dos transtornos do processamento, que diminuem a sensibilidade do método (NIELSEN & TOFT, 2008; STEHMAN, 1993).

Outra técnica que permite a visualização dos bacilos nas fezes ou tecidos submetidos aos testes histopatológicos é a coloração do esfregaço pelo método Ziehl-Neelsen. No entanto, a simples visualização não permite diferenciar MAP de outras espécies micobacterianas (baixa especificidade do teste). Além disso, quando os animais eliminam poucas micobactérias nas fezes, a baciloscopia pode levar aos resultados falsos negativos. Por estas razões, apesar de ser rápido e de baixo custo, a baciloscopia não é recomendado para o diagnóstico da doença (LILENBAUN *et al.*, 2007).

Os testes sorológicos mais utilizados para detecção dos anticorpos contra MAP (sorodiagnóstico) são os ensaios de imunoabsorção (ELISA), de fixação

do complemento (CF) e imunodifusão em gel de agar (IDGA). Estes métodos são relativamente fáceis de executar e baratos, mas sua especificidade depende dos antígenos utilizados para captura dos anticorpos e a sensibilidade varia nas diferentes fases da infecção (SHERMAN *et al.*, 1984; KREEGER, 1991; SOCKETT *et al.*, 1992). Segundo Bakker *et al.* (2000), o teste ELISA terá uma sensibilidade crescente a partir de zero, nas fases iniciais da doença, até 100%, quando o animal começar a mostrar sintomas clínicos. Os resultados do sorodiagnóstico são muitas vezes determinados por referência a resultados de cultura de fezes, que em si tem desconhecida sensibilidade em bovinos subclínicamente infectados. Quando usado para confirmar o diagnóstico da PTB em vacas com sinais clínicos, os testes sorológicos tem um desempenho muito bom (OIE, 2014).

O ensaio de ELISA oferece maior sensibilidade que os testes de fixação do complemento (CF) e imunodifusão em gel de agar (IDGA) (STABEL, 1998; AYELE *et al.*, 2001) se tornando melhor para determinar a prevalência da infecção de um rebanho. Logo, o ELISA é o teste mais utilizado, tanto para análise das amostras do soro, quanto para leite, na triagem rebanhos e nos programas de controle (GILARDONI *et al.*, 2012; NIELSEN & TOFT 2008; STABEL, 1998). Segundo Hermel (1998), a sensibilidade do ELISA para casos clínicos tem sido relatada como sendo de 85%, já para casos subclínicos a sensibilidade é de cerca de 15%. Uma pré-absorção de soro utilizando amostras de *M. phlei* com objetivo de remover os anticorpos contra antígenos comuns para diferentes espécies micobacterianas (YOKOMIZO *et al.*, 1991) ou utilização dos antígenos MAP-específicos pré-selecionados para captura (MON LAURA *et al.*, 2012; FACCIUOLO *et al.*, 2013) tem aumentado a especificidade do ELISA comercial.

Outro teste sorológico, o teste de fixação do complemento (CF) é mais frequentemente usado para testar gado para fins de importação e exportação (STABEL, 1998). Este método detecta anticorpos fixadores do complemento para MAP no soro sanguíneo. Sua especificidade é considerada menor que IDGA e ELISA (COLLINS& MANNING, 2001; AYELE *et al.*, 2001).

Entre testes que se baseiam na verificação da resposta imune celular contra MAP é o teste intradérmico PPD *in vivo* (Intradermorreação) que se

fundamenta no desenvolvimento de uma reação de hipersensibilidade tardia tipo retardada (DTH) na resposta a injeção intradérmica do antígeno, dos extratos protéicos purificados obtidos a partir de MAP, que são conhecidos como PPD Johnina ou Paratuberculina (BANNANTINE *et al.*, 2010; ROBBE–AUSTERMAN *et al.*, 2006; MANNING and COLLINS, 2001).

Teste intradérmico continua sendo amplamente utilizada no diagnóstico da PTB apesar da sua baixa sensibilidade e especificidade. Este teste é considerado positivo quando há um aumento da espessura da pele maior que 3 mm após 24 a 72 h (NIELSEN *et al.*, 2001). A desvantagem do teste é devida à alta frequência de resultados falso-positivos, devido à reação antigênica cruzada com micobactérias presentes no ambiente (LILEMBAUN *et al.*, 2007; HARRIS & BARLETTA, 2001).

No entanto, alguns autores não recomendam o uso do PPD para o diagnóstico da PTB devido à baixa especificidade e a uma fraca correlação com o estado de infecção do animal (CHIODINI, 1984a; COCITO *et al.*, 1994; COLLINS, 1996).

Outro teste de imunidade celular é IFN- $\gamma$ , um ensaio de detecção da resposta mediada por células *in vitro*. O método baseia-se na produção e liberação de IFN- $\gamma$  por linfócitos bovinos isolados do sangue de animais estimulados *ex vivo* frente a vários antígenos micobacterianos, incluindo PPD Jonina e PPD *M. bovis* (MUNIR *et al.*, 2014; WOOD *et al.*, 1992). Posteriormente, a quantificação do IFN- $\gamma$  realiza-se mediante ELISA (MUNIR *et al.*, 2014, GARRIDO *et al.*, 2000; STEWART *et al.*, 2004). O ensaio é útil para bovinos jovens, recentemente infectados, e que ainda são soronegativos (PALIOCHI & ROMANO, 2007). Todavia, é pouco utilizado para o diagnóstico da PTB, pois têm como desvantagem a necessidade de manter *ex vivo* os linfócitos indicados para a estimulação, devendo ser executado num curto período após a colheita de amostras e os resultados do ensaio são de difícil interpretação. Não existe um acordo na interpretação e nem em relação aos tipos e quantidades de antígenos usados para estimular os linfócitos do sangue (OIE, 2014; NIELSEN & TOFT, 2008).

A introdução de métodos baseados na detecção molecular de DNA micobacteriano em diversos materiais incluindo leite, tecidos e fezes, através

da reação PCR, foi um avanço no diagnóstico da PTB. A caracterização das sequências de inserção, IS900 e IS901, F57 como sendo específicas para MAP proporcionam uma excelente ferramenta de detecção desta micobactéria e sua diferenciação das outras espécies e subespécies micobacterianas através de PCR (SLANA *et al.*, 2009; VARY *et al.*, 1990; PALIOCHI & ROMANO, 2007). É uma técnica rápida que permite a obtenção dos resultados em três dias, em comparação com as várias semanas necessárias para a cultura (CHAUDHARY *et al.*, 2009). No entanto, a larga utilização desta técnica é limitada devido: i) dificuldade de obtenção de amostras de DNA de qualidade, principalmente de fezes dos animais que carregam vários inibidores de reação, como grandes quantidades de DNA irrelevante, polissacarídeos, sais biliares entre outros; ii) alta sensibilidade da técnica pode produzir resultados falsos positivos devido a contaminação com amostras previamente amplificadas; iii) requerimento de equipamentos específicos, técnicos e mão de obra especializados, o que aumenta o custo deste tipo de diagnóstico limitando seu uso em países em desenvolvimento (LILENBAUM *et al.*, 2007). Seu limite de detecção é de  $10^4$  bactéria /g da amostra o que torna-se uma limitação para o uso. Outro fator limitante é o custo adicional do pré-tratamento da amostra fecal utilizando membrana de sílica em mini-colunas ou partículas magnéticas, que podem aumentar a taxa de detecção de MAP por PCR (STING *et al.*, 2014 ; MUNIR *et al.*, 2014 ).

No Brasil, existe uma carência grande de métodos de diagnóstico da PTB, principalmente no que se refere ao custo, rapidez e sensibilidade sendo a maioria dos casos diagnosticados por aspectos anatomo-histopatológicos e confirmados por testes laboratoriais específicos tais como cultura e ELISA. Outros testes laboratoriais são utilizados raramente. Nos casos avançados da doença de Johne comumente observa-se linfangite, sendo a característica macroscópica presuntiva do diagnóstico da PTB. As principais lesões macroscópicas da doença ocorrem no intestino delgado e caracterizam-se por acentuado espessamento da mucosa, que assume aspecto rugoso e megalia dos linfonodos mesentéricos (DRIEMEIER *et al.*, 1999; CHIODINI *et al.*, 1984). As principais alterações microscópicas são observadas no intestino delgado, mais especificamente no jejuno e íleo, nos vasos linfáticos do mesentérico e

nos linfonodos mesentéricos, e incluem enterite, linfangite e linfadenite granulomatosa associados aos BAAR em macrófagos (CHIODINI *et al.*, 1984; KREEGER, 1991).

O diagnóstico da PTB por aspectos anatomo-histopatológicos se torna desvantajoso, pois somente diagnostica animais *post mortem*, pois se tem o maior interesse dos testes em animais vivos minimizando o impacto econômico causado pela doença.

Em vários países, a técnica de ELISA é rotineiramente utilizada para análise das amostras de leite e soro, na triagem de rebanhos e nos programas de controle (NIELSEN *et al.*, 2007). No entanto, no Brasil, os kits comerciais ELISA de diagnóstico são importados e acabam custando caro para o diagnóstico de rotina. Além disso, as técnicas de cultura e PCR também são caras, com isso acaba dificultando o diagnóstico da doença e a inserção nos programas de controle.

Em relação ao tratamento, atualmente não existe um que seja efetivo para a PTB devido à alta resistência da micobactéria causadora da doença aos antibióticos existentes. Isso exige esquemas prolongados de tratamento, isolamento das cepas para testes de susceptibilidade a drogas e uso de diferentes fármacos em combinação (BORODY *et al.*, 2007., ST-JEAN and JERNIGAN, 1991). Tudo isso demonstra que o tratamento da PTB do gado não é justificável economicamente. Além disso, o tratamento é pouco efetivo, pois não bloqueia completamente a eliminação de bactérias nas fezes e, com isso, não contribui para o controle da PTB nos rebanhos (HARRIS and BARLETTA, 2001).

A vacinação contra PTB é uma medida bastante contraditória, uma vez que pode ajudar na prevenção da manifestação clínica da doença e, através disso, na redução de eliminação massiva de bactérias com as fezes. Por outro lado, não previne necessariamente a infecção dos animais jovens (LU *et al.*, 2013a). A vacinação interfere ainda no diagnóstico por meio de testes imunológicos, não somente da PTB, mas também da tuberculose bovina, afetando a eficácia dos programas nacionais de erradicação da Tuberculose bovina já existentes (OIE, 2014). Por essas razões, a vacinação como medida de controle da PTB no gado bovino não foi aceita na maioria dos países,



apesar da autorização do seu uso em pequenos ruminantes não submetidos a programas de tuberculose (JUSTE and CASAL, 1993).

No entanto, alguns países com problemas substanciais de infecção por MAP e relativamente baixa incidência da tuberculose bovina, entre eles Austrália, EUA, Canadá, fazem uso da vacinação como medida de controle da infecção em alguns rebanhos (BATISDA and JUSTE, 2011; FRIDRIKSDOTTIR *et al.*, 2000).

## **2.10. Iniciativas para um diagnóstico preciso da Paratuberculose bovina**

As dificuldades apresentadas sobre o diagnóstico da PTB revelam que existe uma grande necessidade no desenvolvimento de métodos sensíveis, simples e de baixo custo. A praticidade de métodos imunológicos para o diagnóstico da PTB incentiva pesquisadores a buscar novas abordagens para este tipo de diagnóstico, incluindo o imunodiagnóstico fecal. A OIE, 2014 sugere como novos métodos de diagnóstico da PTB, a detecção de antígenos em fezes ou em tecidos principalmente em animais vacinados.

Em relação aos métodos de diagnósticos, várias metodologias têm sido abordadas também no contexto de isolar antígenos e Imunoglobulina A (IgA) das fezes de animais, e de humanos com doença intestinal provocada por helmintos (ERIKSEN *et al.*, 1996; CHARDES *et al.*, 1990; ROSOFF & STIBBS, 1986) e bactérias como *Helicobacter pylori* (KOLETZKO *et al.*, 2003), e em pacientes com doença de Crohn (KINOSHITA, *et al.*, 2001).

Aumento nos títulos de IgA fecal foi considerado como um confiável indicador de infecção por Rotavírus, mesmo na ausência de partículas virais detectáveis nas fezes (BERNSTEIN *et al.*, 1996). Curiosamente, devido à associação entre MAP e a doença de Crohn (DC) em humanos, foram realizados estudos de imunoglobulinas anti-MAP em soro e fluido intestinal de pacientes com DC, demonstrando um aumento na concentração de IgA e IgG total no soro e de apenas IgG em pacientes com DC (VERDIER *et al.*, 2013).

Em animais com PTB, observou-se que são reconhecidos pela presença dos anticorpos IgM e IgG contra antígenos de MAP no soro, o que foi bem demonstrado (BIET *et al.*, 2008), mas a produção de IgA específica e a sua presença nas fezes e fluidos intestinais ainda não foram investigadas. Vale ressaltar que a infecção do gado por MAP ocorre através da mucosa intestinal, induzindo a produção e secreção de IgA específica. A IgA representa a classe de anticorpo mais proeminente na superfície de mucosa intestinal, onde desempenha a primeira linha de defesa da mucosa, sendo um candidato ideal para utilização como um agente terapêutico ou profilático (MESTECKY *et al.*, 1999). Sua função inicial é impedir que micro-organismos se liguem à mucosa, fazendo com que esses não consigam se ligar e penetrar a mucosa o que causaria a infecção (MANTIS *et al.*, 2011).

A IgA é produzida diretamente nos tecidos linfóides de mucosas por plasmócitos locais, e sua secreção é mediada pelo receptor poli-Ig que está presente nas células epiteliais intestinais, capaz de transportar ativamente a IgA por vesículas até o lúmen intestinal (PILLAI, *et al.*, 2012). A IgA que é excretada nas secreções ocorre predominantemente como complexo dimérico contendo dois peptídeos adicionais, denominados cadeia-J e componente secretório (SC). A IgA secretória (SIgA) tem importância na proteção da mucosa intestinal contra a adesão e invasão de patógenos entéricos (MICHETTI, *et al.*, 1992) e tem sido apoiada por estudos em que a proteção foi associada com a presença de IgA específica em secreções, tais como fezes (MICHETTI, *et al.*, 1992). A SIgA apresenta essas funções por ser capaz de suportar a ação de enzimas proteolíticas presente no trato gastrointestinal. Sendo assim, os níveis e a especificidade das IgAs presentes na mucosa constituem um bom marcador dos eventos imunológicos no trato gastrointestinal (VAERMAN, 1984).

Além da SIgA, outra estratégia para o diagnóstico da PTB são as proteínas secretadas em meio de cultura durante o crescimento de MAP, devido sua interação inicial com o sistema imune do hospedeiro. Estas proteínas têm sido estudadas como possíveis candidatas a vacina e para o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico (MUTHARIA *et al.*, 1997).

Antígenos secretados pelas micobactérias metabolicamente ativas poderiam ser alvos interessantes para o reconhecimento na imunodeteção. No caso das infecções micobacterianas intestinais, como PTB, as fezes podem ser utilizados como material de imunodeteção da presença de bactéria e seus antígenos no trato intestinal. A utilidade desta abordagem foi demonstrada recentemente para diagnóstico da outra infecção do trato gastro-intestinal, provocada por *Helicobacter pylori*. A imunodeteção dos antígenos deste patógeno em fezes através do ELISA é um dos principais métodos do diagnóstico desta infecção atualmente (KOLETZKO *et al.*, 2003).

Membros do gênero *Mycobacterium* secretam uma variedade de proteínas que são detectáveis em filtrado de meio de cultura. Dentre elas, destaca-se um complexo de 45/47 kDa denominado APA (alanine-proline antigen) ou Mtb 32, que contém uma alta porcentagem de alanina (20%) e prolina (20%), e é uma das proteínas ativamente secretadas pelas micobactérias durante seu crescimento. No filtrado do meio de cultura, este complexo protéico representa 2% de todo material secretado e possui as propriedades antigênicas imunodominantes (HORN C. *et al.*, 1996).

A proteína APA se encontra em várias micobactérias tais como *M. bovis* BCG, *M. bovis* (MB), *M. tuberculosis* (MT) e MAP. Esta proteína está expressa de forma diferente nas bactérias de família *M. tuberculosis* e *M. avium*. A composição de aminoácidos de APA de *M. avium subsp. paratuberculosis* difere em comprimento com outros ortólogos. MAP-APA possui 368 resíduos, 43 aminoácidos a mais que no complexo de *M. tuberculosis* (GIOFFRÉ *et al.*, 2009). Foi demonstrado que em sobrenadante de filtrado de cultura de MAP, MAP-APA apresenta peso molecular 50 – 60 kDa e MB- Apa ou MT-Apa apresenta um peso de 45 – 47 kDa no sobrenadante de cultura destas micobactérias (GIOFFRÉ *et al.*, 2009).

Esta proteína possui um domínio que liga a fibronectina podendo, portanto, estar envolvido na virulência do bacilo, especialmente no período inicial da infecção (GIOFFRÉ *et al.*, 2009). Foi demonstrado que esta proteína está localizada na parte interior do envelope celular, possui capacidade de

aderir a fibronectina (FAP- fibronectin-attachment protein) e está mediando a interação da micobactéria com as células M das placas de Peyer do intestino, considerada como porta de entrada na invasão (SECOTT *et al.*, 2004). Sendo assim, as propriedades imunogênicas desse antígeno facilita a obtenção de anticorpos contra estas proteínas e a produção de anticorpos monoclonais seria de grande relevância, uma ferramenta útil e definitiva na identificação da doença.

### 3. Justificativa

A Paratuberculose bovina continua entre os maiores problemas veterinários provocando grandes perdas econômicas, principalmente nos países de agropecuária industrial, como Brasil. Apesar de pertencer às enfermidades da Organização Mundial da Saúde Animal que compreendem as doenças transmissíveis de importância socioeconômica e/ou de importância em saúde pública, cujo controle é necessário para o comércio internacional de animais e alimentos de origem animal (OIE, 2010), o programa estatal de controle da PTB não existe no Brasil e a incidência da PTB é subestimada. Um gargalo na vigilância mais ampla dos animais infectados por MAP é a falta dos métodos simples e específicos para diagnóstico da PTB que permita a identificação de animais positivos em estágios subclínicos da infecção. Portanto, o diagnóstico preciso e específico da PTB, ainda é um desafio. Isso pode estar associado à baixa sensibilidade dos testes laboratoriais ou à variação da resposta imunológica frente à infecção por MAP. Novas abordagens para imunodiagnóstico baseadas na detecção e identificação de antígenos de MAP ou IgA em fezes, utilizando anticorpos podem ser úteis para diagnóstico. Um dos antígenos ativamente secretado por MAP que pode ser utilizado como alvo de detecção é a proteína APA (SOUZA *et al.*, 2011).

Este projeto visa estabelecer métodos imunológicos através de detecção da IgA específica e dos antígenos de MAP, incluindo antígeno APA, nas fezes dos animais doentes ou assintomáticos. Como ferramentas para estes métodos foram utilizados anticorpos de fácil produção em grande escala - os anticorpos IgY produzidos em ovos das galinhas imunizadas e anticorpos monoclonais produzidos pelos hibridomas gerados em nosso laboratório (SOUZA *et al.*, 2011), onde foram desenvolvidos um kit de ELISA sanduiche anti-APA para imunodiagnóstico rápido da PTB em fezes de animais para melhorar o diagnóstico dessa enfermidade (patente depositada). A eficácia da detecção dos animais infectados foi feita através da utilização do novo kit em comparação com métodos convencionais (o sorodiagnóstico, utilizando kits de ELISA comerciais).

## 4. Objetivos

Desenvolver novos métodos imunoquímicos para o diagnóstico de paratuberculose em fezes de gado bovino utilizando como ferramenta novos anticorpos monoclonais específicos e IgA

### 4.1- Objetivos específicos

- 1) Coletar amostras de material biológico (fezes e sangue) de gado com doença clínica ou suspeitos em PTB para testes de imunodiagnóstico convencionais (sorodiagnóstico) e novos métodos de imunodeteção de antígenos micobacterianos em fezes;
- 2) Estabelecer protocolos para a detecção de IgA em material fecal de bovinos com PTB (ELISA, *Western Blotting*);
- 3) Detectar IgA nas fezes de animais com PTB, bem como verificar seu reconhecimento de antígenos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* e *M. bovis* por métodos imunoquímicos (ELISA, *Western Blotting*);
- 4) Produzir anticorpos anti-APA nos ovos de galinhas imunizadas pela proteína APA-MAP recombinante;
- 5) Estabelecer protocolos de detecção e isolamento do antígeno APA -MAP nas fezes de bovinos com PTB utilizando anticorpos anti-APA policlonal IgY de galinha e monoclonal IgG murino já produzidos como ferramenta;
- 6) Produzir os kits de ELISA sanduíche (mini-kit e kit completo) indicados para detecção do antígeno APA-MAP nas fezes do gado;
- 7) Identificar animais com PTB nos rebanhos com histórico prévio de PTB através de avaliação clínica, métodos convencionais do diagnóstico laboratorial, incluindo o sorodiagnóstico (utilizando kit ELISA comercial) e novos testes imunoquímicos propostos para diagnóstico em fezes.

## **5. Metodologia**

### **5.1. Coleta de material biológico do gado com PTB**

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal e o sangue foi obtido por punção na veia coccígea com ajuda dos veterinários da equipe. Ambas as amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos com tampa, identificadas, refrigeradas e transportadas ao LBR, UENF. A coleta foi realizada nas fazendas do estado do Rio de Janeiro: Penedo e Vassouras (fazendas com histórico da doença), Lagoa de Cima e São José de Ubá e na Argentina gentilmente cedida pelos colaboradores do INTA (Dra Maria Isabel Romano). As fezes obtidas dos animais de Penedo (RODRIGUES,2009; SOUZA *et al.*,2011) e Argentina foram de bovinos com PTB com confirmação clínica e laboratorial da doença através dos seguintes testes convencionais: coprocultura, ensaio PCR para detecção de DNA micobacteriano nas fezes. Como controles negativo foram utilizados fezes e soros de animais sadios oriundos da UAP – Unidade de apoio á pesquisa animal da UENF, onde foi executada a vacinação de rotina segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 760 x g, a 4 ° C durante 10 minutos e as amostras de soro obtidas foram armazenadas a -20 °C até à sua utilização. Os materiais fecais coletados foram armazenados a -70 °C.

### **5.2. Isolamento de IgA nas fezes de animais com PTB**

As fezes foram descongeladas e amostra de 0,1g foi diluída em 0,5 ml de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST 0.05%) na presença de mistura dos inibidores de proteases (Sigma). Após centrifugação (10.000X g por 30 min). O sobrenadante fecal foi submetido a diferentes métodos de concentração: 1) precipitação com proteína A/G agarose; 2) concentração por ácido caprílico. Os precipitados foram aplicados em tampão de amostra, fervido por 5 minutos e aplicados no gel de SDS- PAGE a 12%, e as proteínas foram eletrotransferidas para uma matriz de nitrocelulose com poros de 0,45µm

(Amersham Life Sciences), de acordo com Towbin *et al.* (1979), utilizando o equipamento de transferência líquida BioRad em tampão de transferência Tris-Glicina (25mM Tris, 192 mM glicina e 20% de metanol) por 1h e 40 min em 250 mA constantes. Após a transferência das proteínas, as membranas foram incubadas com solução bloqueadora (1% de gelatina em PBS T) durante 1h à temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-Ig total de bovino conjugado à peroxidase (Southern Biotechnologies Associates), diluído 1:10000 e anti-IgA de bovino conjugado à peroxidase (Bethyl, Tx, USA) diluído 1:30000 em PBST 0.05%, por 1 h à temperatura ambiente. A revelação da membrana foi realizada com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB (diaminobenzidina) (100µl Tris-HCL 2 M pH 7,5, 4,9 ml de água destilada, 5 mg DAB, 0,3ml imidazol 0,1 M, 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **5.3- Imunodeteção de antígenos de MAP utilizando IgA isolada de sobrenadante fecal através de ELISA.**

Para execução do método, placas de poliestireno de fundo plano (Nunc) foram sensibilizadas com lisados O-BCG-wcl, *M. avium*- wcl, rAPA de *M. avium. paratuberculosis* (cedida pelo INTA-Argentina). Cinquenta microlitros destes antígenos na concentração de 2µg/mL diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.7 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.015 M; NaHCO<sub>3</sub> 0.035 M) foram adicionados para cada orifício da placa teste de ELISA separadamente e incubados por 18 h a 4<sup>o</sup>C. A seguir, os poços foram lavados duas vezes em PBST 0.05% e bloqueados 1% de gelatina por 1h. Passado o tempo de bloqueio, a placa foi lavada com PBST 0,05% por duas vezes. Como anticorpo primário, foi utilizado sobrenadante fecal obtido por centrifugação, onde foi incubada por 1 h. A fim de evitar ligações primárias inespecíficas, a placa foi lavada três vezes com PBST 0,05%. Posteriormente foi utilizado o anticorpo secundário anti-IgA de bovino conjugado à peroxidase diluído 1:30000 em PBST 0.05%, por 1 h à temperatura ambiente. A placa, então, foi lavada três vezes com PBST 0.05%. A reação foi revelada com 50 µl da solução OPD (o-fenilenodiamina – 2HCl, ácido cítrico 20mM, fosfato de sódio 40mM). A reação foi interrompida adicionando-se 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N por poço. A leitura foi



realizada em espectrofotômetro a 492 nm. Como controle negativo foi utilizado sobrenadante fecal extraído de fezes de animais sadios.

#### **5.4 - Imunização das Aves e coleta de ovos e soro**

As aves da linhagem não-isogênica Hysex Brown, foram adquiridas com 3 meses de idade e mantidas sob condições adequadas em biotério do LBR (Aviário – P4). Para as imunizações, foi necessário aguardar o início da postura, onde as aves foram imunizadas via intramuscular no músculo peitoral com 50 µg de proteína recombinante rAPA (doada pela Dra. Maria Isabel Romano, INTA, Argentina). Foram feitos cinco ciclos de imunização, sendo o 1º com adjuvante completo de Freund (ACF) (SIGMA), e o 2º com adjuvante incompleto, com intervalo de 21 dias entre si. Duas semanas após a 2ª imunização foram realizados três boosters com 40 µg de proteína rAPA diluído em PBS com intervalo de 14 dias. Os ovos foram coletados uma semana antes da imunização, e por todo o período de imunização das aves, para a extração de anticorpos IgY da gema. Os ovos foram lavados e armazenados em geladeira a 4°C.

As amostras de sangue foram coletadas por punção através da veia ulnar das aves periodicamente e soro foi armazenado para verificação do sucesso da imunização e análises comparativas com a titulação obtida a partir do extrato de gemas dos ovos, utilizando a metodologia descrita por Almeida *et al.* (1998). Os protocolos de imunização das galinhas foram aprovados pela CEUA da UENF (protocolo 077).

##### **5.4.1 - Isolamento de IgY**

As gemas foram previamente separadas da clara e lavadas com água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>). O extrato foi retirado por punção, diluído e acidificado (pH 5,0). A solução de gema foi deixada em repouso *overnight* a 4°C. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 10.000 g por 30 min. Ao sobrenadante foi adicionado 29% de sulfato de amônio, sob agitação em metodologia descrita por Almeida *et al.* (1998).

A solução foi mantida em temperatura ambiente, com pH reajustado para 7,4 - 7,5, sob agitação por 2h, e recentrifugada a 10.000 Xg por 30 min. O material

resultante foi submetido a um processo de diálise, seguido de alíquotamento e armazenagem a 4°C, para análises posteriores.

### **5.5. Processamento das amostras para detecção do antígeno APA no sobrenadante fecal**

Aproximadamente 1 g de fezes foi diluída em 3 ml de PBST 0.05% contendo cocktail de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich). As amostras foram homogeneizadas sob agitação mecânica em vortex. As suspensões fecais foram centrifugadas a 5000X g durante 20 min a 4 °C. Uma porção do sobrenadante (2 ml) foi transferida para um tubo Eppendorf estéril e utilizado para testes ou armazenado a -20 °C.

### **5.6. Imunodetecção e isolamento do antígeno APA do sobrenadante fecal por técnica *Western blotting*, com ou sem imunoprecipitação prévia.**

Os sobrenadantes das fezes de bovinos com manifestações clínicas da PTB e animais sadios foram submetidos a eletroforese SDS-PAGE e *Western blotting* utilizando protocolos convencionais. Alternativamente, os sobrenadantes fecais foram previamente imunoprecipitados utilizando os Mabs anti-APA e proteína A/G-agarose (CALBIOCHEM) para concentrar e isolar o antígeno APA. A presença da proteína APA no sobrenadante foi verificada através de análise do imunoprecipitado por *Western blotting*. O soro policlonal murino ou a IgY anti-APA de gema de ovos obtidos dos animais imunizados correspondentes foram utilizados como anticorpo de detecção.

Para imunoprecipitação, o sobrenadante fecal foi incubado com 6 µl do anticorpo monoclonal anti- rAPA MAP e 30 µl da proteína G-agarose durante uma noite, sob agitação a 4°C. Após esta incubação, a suspensão foi lavada 3 vezes através de centrifugação a 2500Xg por 5 min. O precipitado foi ressuspenso em tampão de amostra e aplicado no gel de SDS- PAGE a 12%. Após eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. Como anticorpo primário para tratamento da membrana foi utilizado IgY anti rAPA por 1 h em temperatura ambiente. A fim de evitar

ligações primárias inespecíficas, a membrana foi lavada três vezes com PBST 0,05%. Posteriormente a placa foi incubada com anticorpo secundário, goat anti- chicken IgY- HRP (diluído 1:800), por 1 h à temperatura ambiente. A revelação da membrana foi realizada com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB (diaminobenzidina) (100µl Tris-HCL 2 M pH 7,5, 4,9 ml de água destilada, 5 mg DAB, 0,3ml imidazol 0,1 M, 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### **5.6.1. Coloração pelo Ácido Periódico de Schiff**

Após a corrida eletroforética o gel foi submetido à coloração pelo Ácido Periódico de Schiff (APS) (JANN, *et al.*, 1975) a fim de verificar a presença de glicosilação de proteínas. O ácido periódico tem a capacidade de oxidar os grupamentos glicol dos carboidratos, transformando-os em grupamentos aldeído. A fucsina básica presente no reativo de Schiff forma um complexo com os grupamentos aldeídos formados, produzindo um composto insolúvel vermelho.

Sumariamente, o gel foi fixado em ácido acético glacial a 7,5% durante 1h a temperatura ambiente, seguido de uma incubação com solução aquosa de ácido periódico a 0,2%, durante 45min a 4°C. Após esta incubação, a solução foi desprezada e o gel foi incubado, durante 45min a 4°C, protegido da luz, com o reativo de Schiff. O gel foi então lavado com ácido acético glacial a 10% para aparecimento das bandas e posteriormente fotografado.

#### **5.7. Imunodeteção de antígeno APA em sobrenadante fecal através de ELISA sanduíche**

A placa de microtitulação de ELISA foi sensibilizada com 100 µl/poço do anticorpo de captura - MAb anti-APA MAP (2µg/ml) em presença do tampão de carbonato-bicarbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,015M + NaHCO<sub>3</sub> 0,035M) por 18h a 4°C.

Em seguida, o anticorpo foi descartado, a placa foi lavada em PBST 0,05% e bloqueada através de incubação com solução de bloqueio (PBST com gelatina a 0,05%) em por 1h a 37°C, para evitar ligações inespecíficas. Após esta etapa, a placa foi lavada 3 vezes com PBST 0,05%, incubada com 100µl/poço do sobrenadante fecal e incubada a 37°C por 1h. Logo após, a placa foi

submetida a uma nova tríplice lavagem com PBST 0,05% e, posteriormente, foi incubada por 1 h a 37°C com 100µl/poço do anticorpo de detecção IgY anti-APA MAP diluído em PBST com 0,5% gelatina.

Posteriormente, a placa foi lavada quatro vezes com PBST e incubada com o anticorpo secundário, goat anti- chicken IgY- HRP (diluído 1:5000) (Calbiochem-Novabiochem Corp.) por 1 h à temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se 100µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N por poço e revelada com 100µl da solução OPD (o-fenilenodiamina – 2HCl, ácido cítrico 20mM, fosfato de sódio 40mM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 492 nm. Como controle positivo, foi utilizado o sobrenadante do meio de cultura de *M. avium* (meio Midlebrook 7H9), o qual contém a proteína APA secretada pela micobactéria. Como controle negativo, foi utilizado o meio de cultura 7H9.

### 5.8. Sorodiagnóstico

Sorologia para a pesquisa de anticorpos anti-MAP foi realizada por meio do ensaio de ELISA, utilizando kit comercial PARAS-4P ID-Vet Screen® Paratuberculosis Indirect Screening test (França) de acordo com instruções do fabricante em placas de microtitulação de 96 orifícios, previamente sensibilizadas com o antígeno do MAP. Para a leitura das placas, foi utilizado um espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm (OD450). A razão amostra/controle positivo (S/P) foi utilizada para a interpretação dos resultados.  $S/P = 100 \times (\text{valor da OD450 da amostra} - \text{valor da OD450 do controle negativo}) / (\text{valor da OD450 do controle positivo} - \text{valor da OD450 do controle negativo})$ .

O ponto de corte para amostras consideradas negativas para anticorpos anti-MAP atendeu a valores S/P iguais ou menores que 60%; para amostras consideradas suspeitas, o ponto de corte figurou entre 60% e 70%; e valores S/P iguais ou maiores que 70% foram considerados como resultados positivos, seguindo recomendações do fabricante.

Ensaio de ELISA também foram realizados utilizando diferentes antígenos micobacterianos. Brevemente, descrição do protocolo a seguir: placas de ELISA foram sensibilizadas com antígenos: rAPA- MAP, lisado bruto da cepa

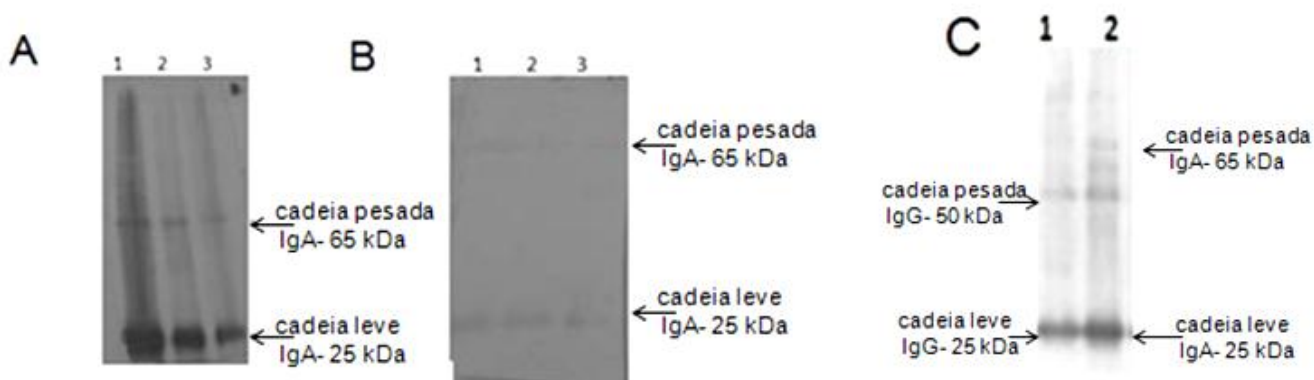
*M. avium* e de lisado bruto da cepa BCG, previamente diluídos com tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). As placas foram bloqueadas com solução PBST 0.5% Gelatina. Foram adicionados os soros controle (positivos e negativos) e os soros dos bovinos a serem analisados, previamente diluídos em PBST-BSA. Após 1 h de incubação, as placas foram lavadas e tratadas com anticorpo anti-IgG bovino conjugado a peroxidase previamente diluído (1:10.000 em PBST- Gelatina) e incubadas por 1 h. Ao término deste período, as placas foram lavadas, e reveladas pela adição da solução substrato, que reagirá com a peroxidase resultando numa coloração quantificada através da espectrofotometria como descrito no item 4.4.

## 6. Resultados

### 6.1. Isolamento de IgA nas fezes de animais com PTB bovina

Para o isolamento de IgA, foi utilizada como controle positivo fezes de bovinos com PTB (RODRIGUES, 2009; SOUZA *et al.*, 2011), com confirmação clínica e laboratorial da doença através dos seguintes testes convencionais: coprocultura, ensaio PCR para detecção de DNA micobacteriano nas fezes e teste imunohistoquímico dos tecidos intestinais. Como controle negativo foram utilizadas fezes dos bovinos sadios livre de PTB (rebanho de produção da UENF monitorado por médicos veterinários).

Foram utilizadas três metodologias na tentativa de isolar IgA nas fezes de animais com PTB (PTB 1 e PTB 2) e sadio: 1º) precipitação do sobrenadante fecal com A/G agarose após centrifugação (Figura 1A); 2º) sobrenadante fecal puro obtido por ultracentrifugação (Figura 1B); 3º) precipitação do sobrenadante fecal com ácido caprílico (Figura 1C). Como demonstram os resultados apresentados na Figura 1, nas amostras de fezes foram observadas as bandas referentes à cadeia pesada de IgA de 65 kDa e a cadeia leve do anticorpo – de 25 kDa, sendo que o isolamento de Ig (imunoglobulina) através de metodologia 1 (Figura 1A) e metodologia 3 (Figura 1C) foi mais eficaz. Na Figura 1C, além da cadeia pesada de IgA, pode ser observada a cadeia pesada de IgG – de 50 kDa, o que demonstra que a IgG também está presente nas fezes e pode ser isolada através da metodologia 3. Os resultados apresentados na Figura 1A e B demonstram a presença de IgA no sobrenadante fecal de animais sadios, sendo que em menor proporção que nos animais doentes.



**Figura 1- Isolamento de Imunoglobulinas das fezes de animais com PTB e sadio.**

Para a detecção de Igs em amostras fecais as amostras de fezes foram diluídas e submetidas precipitação com proteína A/G agarose em **A**. Em **B**, Os sobrenadantes das fezes foram diluídos e submetidos à ultracentrifugação e em **C**, os sobrenadantes foram precipitados com ácido caprílico e submetidos à corrida eletroforética em SDS-PAGE a 12%. A membrana foi tratada com anticorpo utilizando anti-IgA bovino –HRP (1:40.000) e/ou anti- IgG de bovino (1:10.000). A revelação da membrana foi realizada com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB. Canaleta 1, amostra fecal de bovino PTB1; Canaleta 2, amostra fecal de bovino PTB2; Canaleta 3, amostra fecal de bovino sadio.

## **6.2. Avaliação da especificidade anti- micobacteriana de IgA em amostras de fezes de animais com PTB por ELISA**

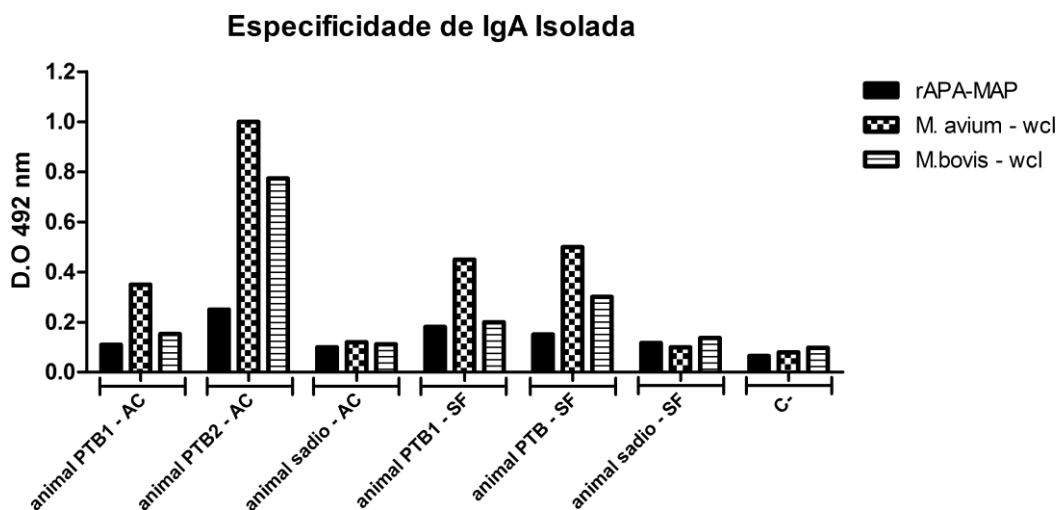
Para verificar se a IgA isolada de fezes dos animais com PTB reconhece antígenos micobacterianos, isto é, verificar especificidade da Ig secretada nas fezes, utilizamos o teste de ELISA.

Nos testes de ELISA, foi utilizado como antígeno de captura diferentes antígenos micobacterianos: rApa- MAP, wcl – *M. avium* e wcl- BCG. Como anticorpo foram utilizadas amostras da IgA fecal isoladas através de duas metodologias: 1ª) IgA isolada através do sobrenadante fecal puro por ultracentrifugação (SF) e, 2ª) IgA isolada através da precipitação com ácido caprílico (AC). Os resultados demonstram que a IgA fecal obtida através de precipitação com ácido caprílico, diferentemente da amostra obtida através de ultracentrifugação, teve um forte reconhecimento dos antígenos

micobacterianos, o que demonstra maior eficácia da primeira metodologia para isolamento da IgA (Figura 2).

A IgA isolada reconheceu fortemente antígenos nos lisados de *M. avium* e BCG, e menor ligação foi observada com a proteína rAPA-MAP. Como esperado, a IgA isolada das fezes do animal sadio não reconheceram antígenos micobacterianos (controle negativo). As amostras da IgA fecal obtidas de dois animais diagnosticados anteriormente para PTB (PTB1 e PTB2) foram positivas, confirmando a infecção micobacteriana desses animais.

O teste proposto (detecção de IgA anti-micobacteriana nas fezes) é útil para o diagnóstico de infecção intestinal provocada pelas micobactérias e sua diferenciação com infecção de outra natureza. Entretanto, essa abordagem não permite diferenciar infecção por *M. avium* e *M. bovis* (PTB e TB bovina, respectivamente) devido à reação cruzada dos anticorpos policlonais com antígenos de diferentes espécies de micobactéria.



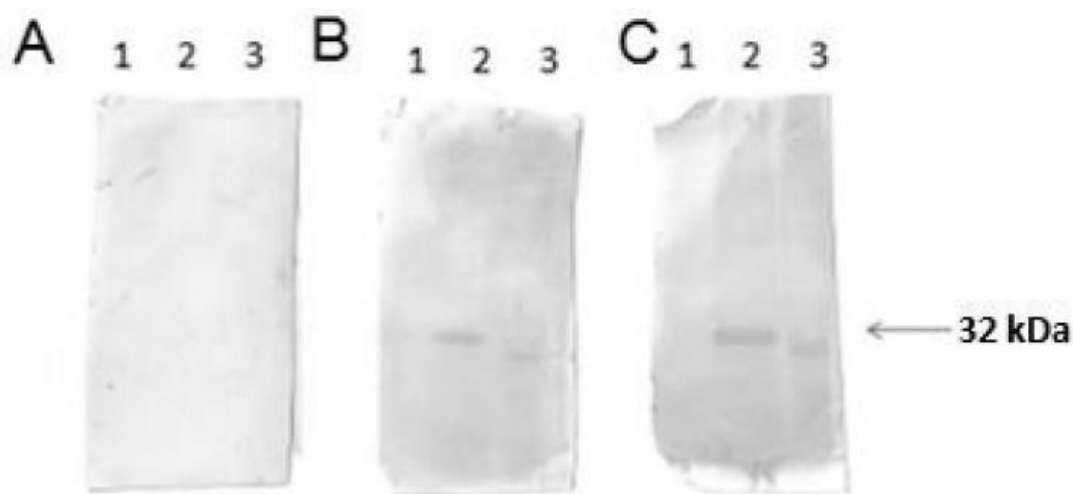
**Figura 2. Verificação da especificidade anti-micobacteriana de IgA no sobrenadante fecal através de ELISA.** As amostras de IgA obtidas das fezes por ultracentrifugação (SF) e pela precipitação com ácido caprílico (AC) foram testadas quanto ao reconhecimento de antígenos micobacterianos. Os antígenos foram diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0.05 M na concentração de 2 µg /mL e colocados 50 µl para cada poço. Como anticorpo de detecção foi utilizado anti-IgA bovino. Para controles negativos foi utilizado PBS e IgA obtida das fezes de animais sadios (C-).



### **6.3. Avaliação da especificidade anti- micobacteriana de IgA em amostras de fezes de animais com PTB por *Western Blotting***

Para confirmar o reconhecimento dos antígenos micobacterianos pela IgA isolada de fezes, e iniciar a identificação dos antígenos reconhecidos, utilizamos ensaio *Western blotting*, que permite discriminar os antígenos reconhecidos de acordo com seu peso molecular. Os antígenos micobacterianos: rApa MAP (1µg/canaleta), *M.avium*- wcl e *M. bovis BCG*- wcl (20 µg/canaleta) foram submetidos ao SDS-PAGE a 10%. Após transferência das proteínas na membrana, estas foram tratadas com sobrenadantes de fezes obtidos dos animais: sadio (Figura 3A), PTB1 (Figura 3B) e PTB2 (Figura 3C).

Os resultados demonstram que as amostras de IgA presentes nas fezes de bovino com PTB1 (Figura 3B) e PTB2 (Figura 3C), diferentemente destas do animal sadio (Figura 3A), reconheceram fortemente uma proteína de aproximadamente 32 kDa em lisado de *M. avium* (wcl –*M. avium*) e uma proteína de aproximadamente 30 kDa em lisado de *M. bovis BCG* (wcl-BCG), que provavelmente representam um antígeno micobacteriano ortólogo. A IgA presente em baixas quantidades nas fezes de animais sadios não mostrou nenhum reconhecimento frente aos antígenos micobacterianos (Figura 3A).



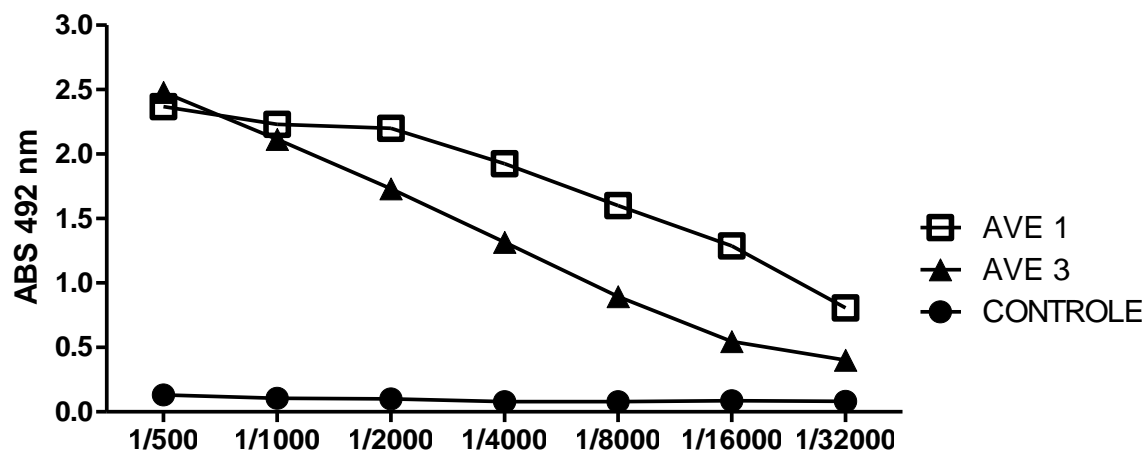
**Figura 3. Imunodeteção de IgA específica no sobrenadante fecal por WB.** IgA obtida a partir do sobrenadante fecal foram testados quanto ao reconhecimento de antígenos micobacterianos. Para a corrida eletroforética em SDS-PAGE a 10% foram utilizados como antígeno a proteína rApa MPTB (1 $\mu$ g/canaleta) canaleta 1; *M. avium*- wcl (20  $\mu$ g/canaleta) canaleta 2, *M. bovis*- BCG wcl (20  $\mu$ g/canaleta) canaleta 3. A membrana foi tratada com sobrenadante fecal de bovinos sadio em **A**, com PTB 1 em **B** e PTB 2 em **C**. Como tratamento secundário foi utilizado anticorpo anti- IgA bovino-HRP (1:40000). A revelação da membrana foi realizada com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB.

#### **6.4. Imunodeteção de antígenos em sobrenadante fecal por anticorpos monoclonais (Mabs) e policlonais**

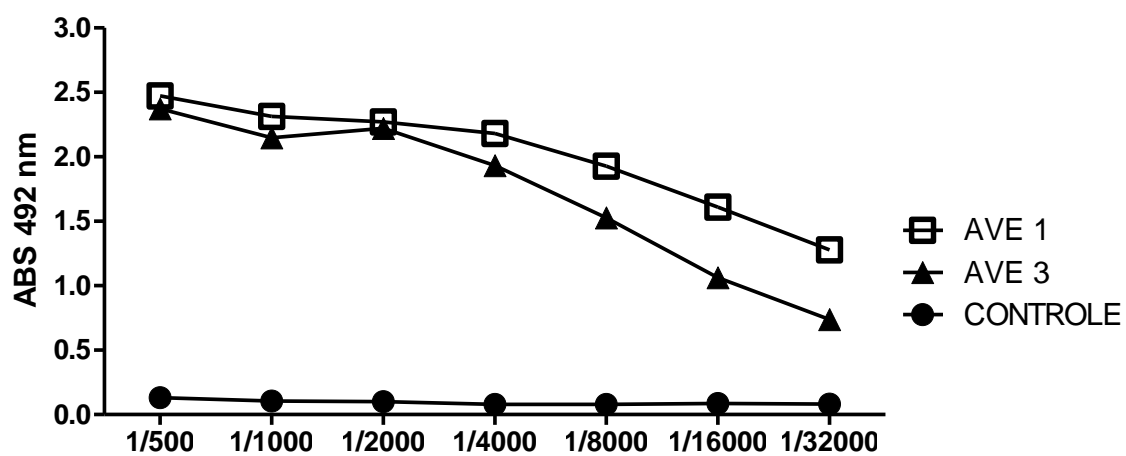
##### **6.4.1 Produção de anticorpos IgY através de imunização de aves com rAPA- MAP**

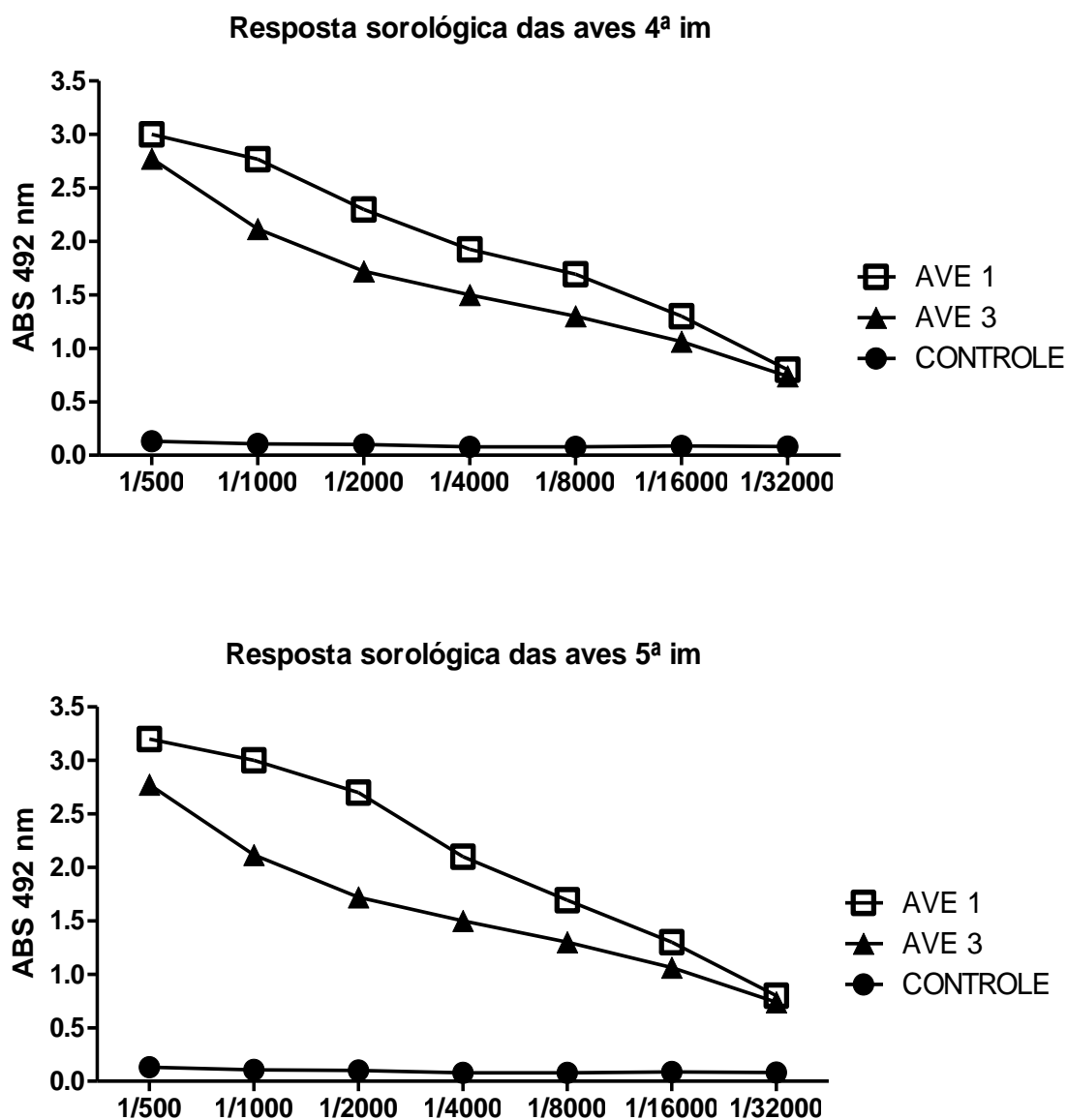
Para a produção de anticorpos IgY anti -APA, foram realizados cinco ciclos de imunizações como mostrados na figura 4. Para validar o processo de imunização, amostras de soros foram testadas por ELISA, visando avaliar o nível de resposta imune das aves. Os soros obtidos foram diluídos em 500X para o início do ensaio. O ELISA foi seriado, com diluições variando de 1:500 a 1:32.000 (Figura 4), mostrando sucesso nas imunizações.

Resposta sorológica das aves 2ª im



Resposta sorológica das aves 3ª im



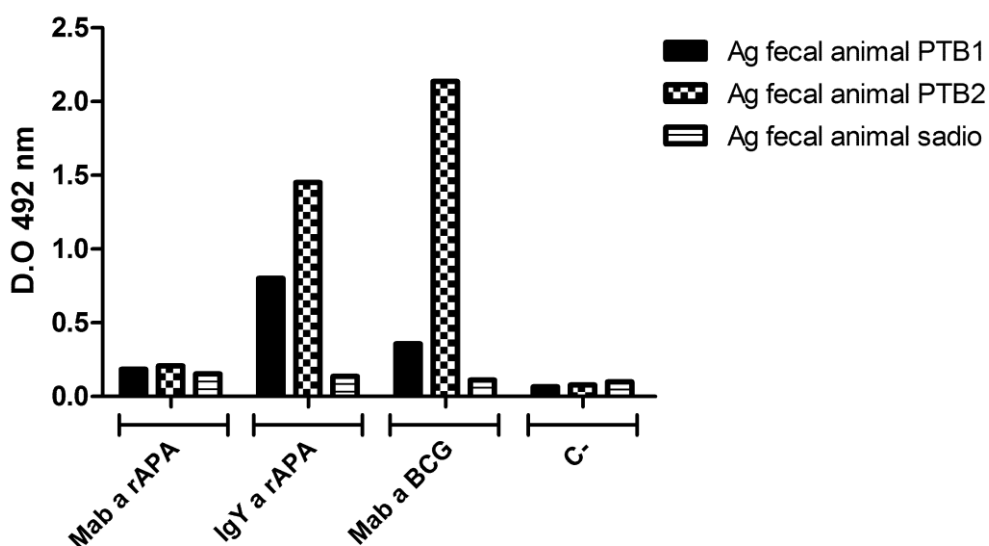


**Figura 4 – Titulação dos anticorpos IgY produzidos.** Titulação dos anticorpos no soro das aves imunizadas com antígeno rAPA MAP. As aves foram imunizadas com 5 inoculações com 50 µg de rAPA e as amostras de sangue foram coletadas no 15<sup>a</sup> dia após cada imunização e testadas por ELISA. Como controle- foi utilizado soro da ave pré – imune. Im-imunização.

Para verificar a utilidade dos Mabs (anticorpos monoclonais) anti-APA MAP, anti-BCG e anticorpos IgY para imunodeteção de antígenos nas fezes de animais PTB1 e PTB2 e sadios, primeiramente foi utilizado o teste de ELISA. Os dados do ELISA (figura 5) demonstram um forte reconhecimento dos antígenos presentes no sobrenadante das fezes de animais PTB2 pelos anticorpos anti-BCG e IgY anti-APA, quando comparado com o reconhecimento

pelo do Mab anti- APA –MAP. A reação foi negativa nos testes de fezes dos animais sadios. Isso sugere a presença de diferentes antígenos de MAP nas fezes dos animais doentes, que podem ser reconhecidos pelos anticorpos policlonais, mas não pelo Mab anti-APA MAP. Os anticorpos anti-BCG foram gerados a partir de imunização do camundongo pela bactéria íntegra (*M. bovis BCG*) que compartilha vários antígenos com MAP, ao contrário do anticorpo anti-APA MAP, que foi gerado a partir de uma única proteína purificada.

O forte reconhecimento da IgY se deve ao fato que as aves foram imunizadas com proteína rAPA na presença do adjuvante Completo de Freund que contém micobactérias BCG mortas na sua constituição, o que pode ter gerado uma resposta imune contra a micobactéria. Reação negativa com Mab anti-APA sugere ausência do antígeno APA nas fezes ou baixas concentrações deste antígeno que não foram detectadas por ELISA indireto. A imunoprecipitação da proteína do sobrenadante fecal com Mab anti-APA pode ser utilizada para concentrar a proteína APA nas fezes.



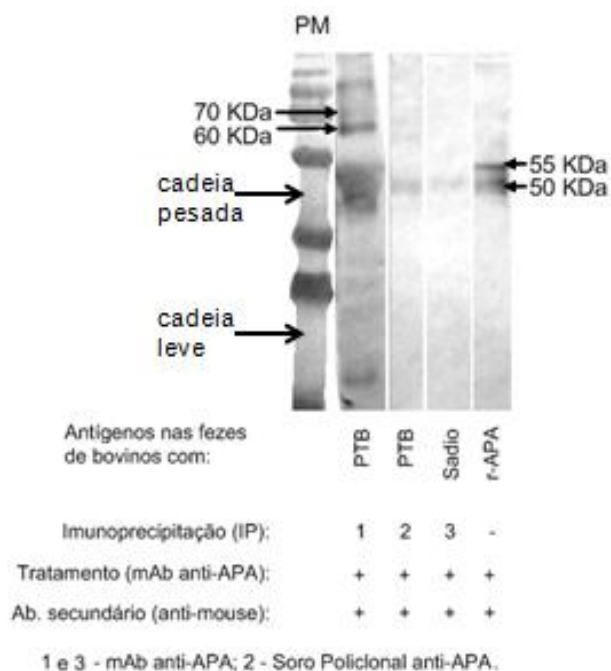
**Figura 5. Imunodeteção de antígenos em sobrenadante fecal de bovino PTB1 e PTB2 através de ELISA indireto utilizando Mabs e soros policlonais produzidos.** Os antígenos foram diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0.05 M na concentração de 2µg/mL e colocados 50µl para cada poço. Como Controle negativo foi utilizado PBS.

### **6.5. Isolamento do antígeno APA do sobrenadante fecal de animais com PTB através de imunoprecipitação**

O isolamento do antígeno APA no sobrenadante fecal foi feito através de imunoprecipitação, utilizando anticorpos monoclonais anti-APA MAP e soro policlonal anti-APA murino MAP (Figura 6). As amostras imunoprecipitadas foram analisadas pela técnica de *Western Blotting*.

Os resultados demonstram (figura 6) que os anticorpos monoclonais anti APA- MAP e o soro policlonal anti-APA murino MAP reconheceram e imunoprecipitaram o antígeno APA no sobrenadante fecal de animal PTB1 e PTB2 (figura 6 canaleta 1 e 2), mas não no sobrenadante de animais sadios (figura 6 canaleta 3). O peso molecular da banda foi maior que peso molecular da proteína APA recombinante (duas subunidades de 50 e 60kDa) sugerindo que a proteína APA secretada por MAP encontra-se nas fezes numa isoforma glicosilada de 70 kDa.

Em conclusão, os anticorpos monoclonais anti-APA de MAP produzidos além de reconhecer bactérias nos cortes do intestino bovino obtido dos animais diagnosticados com PTB (SOUZA, *et al.*, 2011), foram capazes de reconhecer e imunoprecipitar APA- MAP secretadas nas fezes e podem ser utilizados para o imunodiagnóstico das infecções provocadas por *M. avium* subsp. *paratuberculosis* servindo no diagnóstico *antes mortem*.



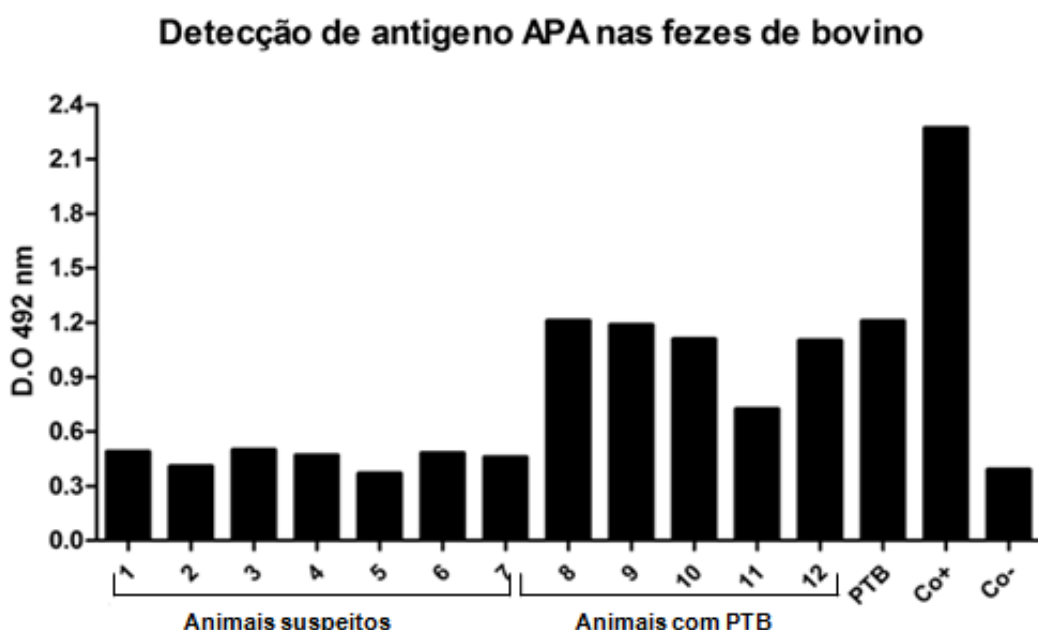
**Figura 6. Isolamento da proteína APA- MAP secretada nas fezes de bovinos com PTB através de imunoprecipitação.**

### 6.6. Imunodeteção de antígeno APA em sobrenadante fecal através de ELISA sanduíche

O resultado acima nos incentivou a produzir kit de diagnóstico para imunodeteção e isolamento do antígeno APA-MAP nas amostras de fezes. Inicialmente, para avaliar a eficácia do kit produzido foram realizados testes de imunodeteção utilizando ensaios de ELISA sanduíche (Figura 7) e *Western blotting* (Figura 8). Como controle positivo, foram utilizadas fezes de bovinos com PTB com confirmação clínica e laboratorial da doença através dos seguintes testes convencionais: coprocultura, ensaio PCR para detecção de DNA micobacteriano nas fezes e teste imunohistoquímico dos tecidos intestinais (RODRIGUES, 2009; SOUZA *et al.*, 2011). Além disso, como controle positivo foi utilizado sobrenadante da cultura de *M. avium* que contém a proteína APA secretada pelas micobactérias.

Para diagnóstico da PTB, sete amostras de fezes bovinas (animais 1-7) foram coletadas de animais nas fazendas do estado do Rio de Janeiro com

histórico prévio da doença e na Argentina (8-12) (bovinos com manifestações clínicas da PTB e confirmação laboratorial) cedidas pelos colaboradores do INTA, Buenos Aires (Dra Maria Isabel Romano), foram submetidas à análise de teste de ELISA (Figura 7) e, após imunoprecipitação com anticorpo Mab anti-APA, estas amostras foram testadas por *Western blotting* (Figura 8).

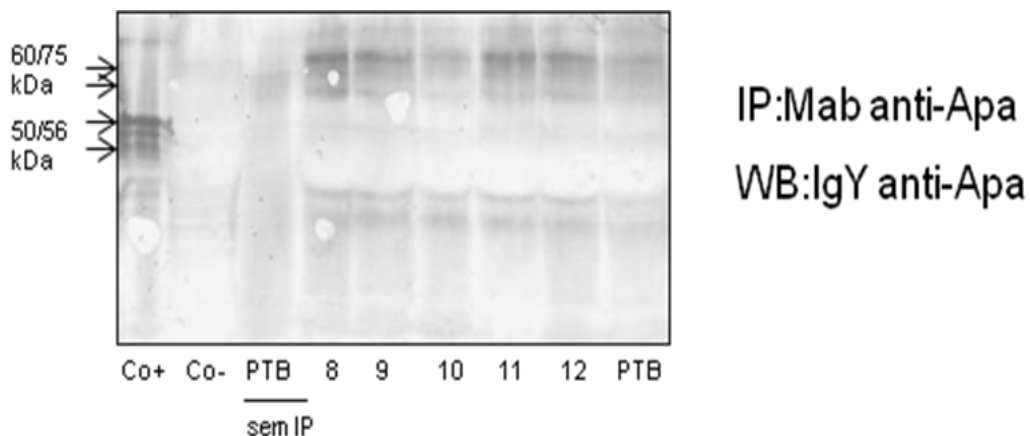


**Figura 7. Imunodeteccão do antígeno APA-MAP em sobrenadantes de fezes de bovinos com PTB, suspeitos e sadios, através de ELISA sanduiche.** Co(+) - controle positivo, sobrenadante do meio de cultura 7H9 utilizado para cultivo de *M. avium* que contém a proteína APA secretada pelas micobactérias. Co(-) – controle negativo, meio de cultura 7H9.

Os resultados obtidos em teste ELISA (Figura 7) demonstram que nos controles positivos (fezes do animal com PTB e sobrenadante da cultura MAP) e em amostras dos cinco animais com PTB foi detectada a presença do antígeno APA MAP (animais 8-12). A ligação dos anticorpos do kit com antígeno APA presente nas amostras positivas foi pelo menos duas vezes maior que nas amostras negativas, levando ao aumento da densidade óptica quantificada pelo espectrofotômetro. A proteína APA não foi detectada nas fezes dos animais 1-7, demonstrando que estes animais não foram infectados.



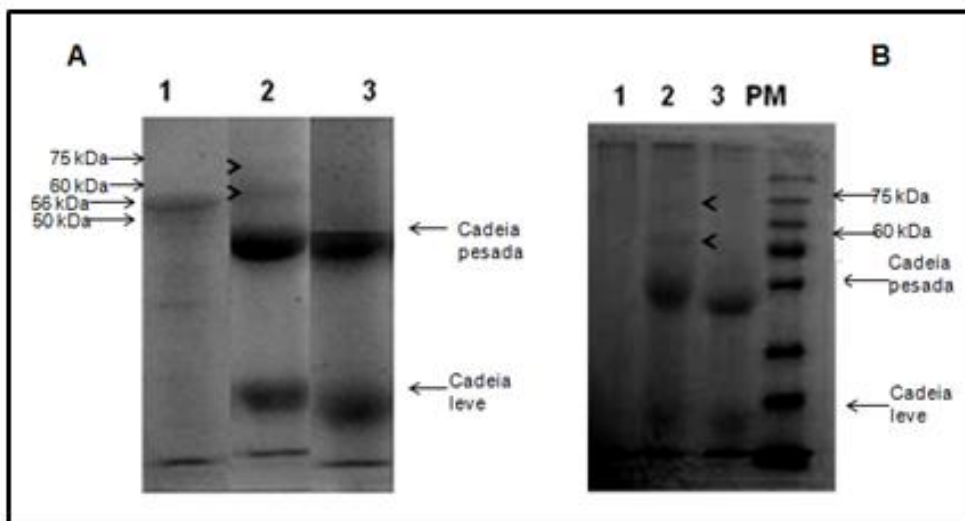
Para confirmar resultados obtidos em ELISA, a presença do APA nas fezes foi verificada através de *Western blotting*. As amostras dos sobrenadantes de fezes foram submetidas a *Western blotting* após imunoprecipitação prévia para isolar e concentrar a proteína testada (Figura 8).



**Figura 8. Imunodeteção do antígeno APA-MAP em sobrenadante fecal de bovinos com PTB, suspeitos e sadios através de *Western blotting*.** Amostras de sobrenadantes foram imunoprecipitados com Mab anti-APA. Os precipitados obtidos foram analisados através de *Western blotting*, utilizando IgY anti-APA para tratamento de membrana. Uma amostra do animal com PTB foi utilizada sem IP prévia. Co(+) - controle positivo, sobrenadante do meio de cultura 7H9 utilizado para cultivo de *M. avium* que contém a proteína APA secretada pelas micobactérias; PTB- fezes da vaca com PTB. Co- - controle negativo, fezes do animal sadio.

A figura 8 demonstra a presença nas fezes dos animais 8-12 e do animal com PTB da proteína APA (forma glicosilada de 60/75 kDa). Isto foi confirmado através de coloração de glicoproteínas com reagente de Schiff (Figura 9B). Vale ressaltar que sem IP, as bandas da proteína são fracas (amostra PTB-sem IP). Na amostra das fezes do animal sadio, a proteína APA não foi detectada.

A Figura 9 demonstra que as bandas da proteína APA recombinante de 50/56 kDa (canaleta 1, Figura 9B), não foram glicosiladas. A proteína APA que foi imunoprecipitada de fezes da vaca com PTB foi corada pelo reagente de Schiff, da mesma forma como cadeias leve e pesada da imunoglobulina utilizada para imunoprecipitação, confirmando a glicosilação destes polipeptídeos (canaleta 2, Figura B) . Nas fezes da vaca sadia a proteína APA não foi encontrada (canaleta 3 Figura 9).



**Figura 9- Confirmação da glicosilação do antígeno APA-MAP em sobrenadante fecal através do reagente de Schiff.** Amostras de sobrenadantes foram imunoprecipitadas com Mab anti-APA e submetido à corrida eletroforética. **A.** O gel foi corado por Comassie; **B.** O gel foi submetido à coloração com reagente de Schiff. Canaleta 1 – proteína APA recombinante; canaleta 2- Amostra fecal de animal com PTB imunoprecipitadas com Mab anti-APA; e 3- Amostra fecal de animal sadio imunoprecipitadas com Mab anti-APA- MAP.

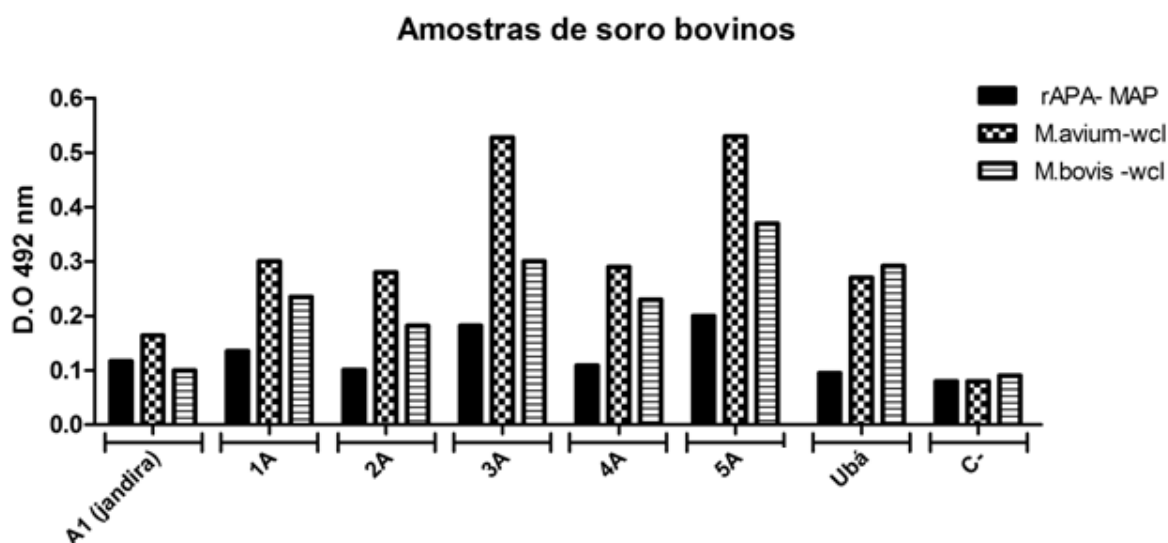
Os resultados de *Western blotting* são coerentes com resultados de ELISA, demonstrando que os animais com a doença confirmada e cinco animais com confirmação laboratorial da doença apresentam a proteína APA-MAP nas fezes o que confirma a infecção pela micobactéria.

### **6.7. Identificação de animais com PTB nos rebanhos da região Noroeste Fluminense comparando métodos convencional (utilizando kit ELISA comercial) e novos testes imunoquímicos propostos para diagnóstico em fezes.**

Para validar o método de diagnóstico proposto em comparação com o método do sorodiagnóstico convencional, as amostras de soros e fezes de bovinos foram coletadas em diferentes fazendas de rebanho leiteiro e processadas e testadas por ELISA. Sete bovinos aparentemente sadios

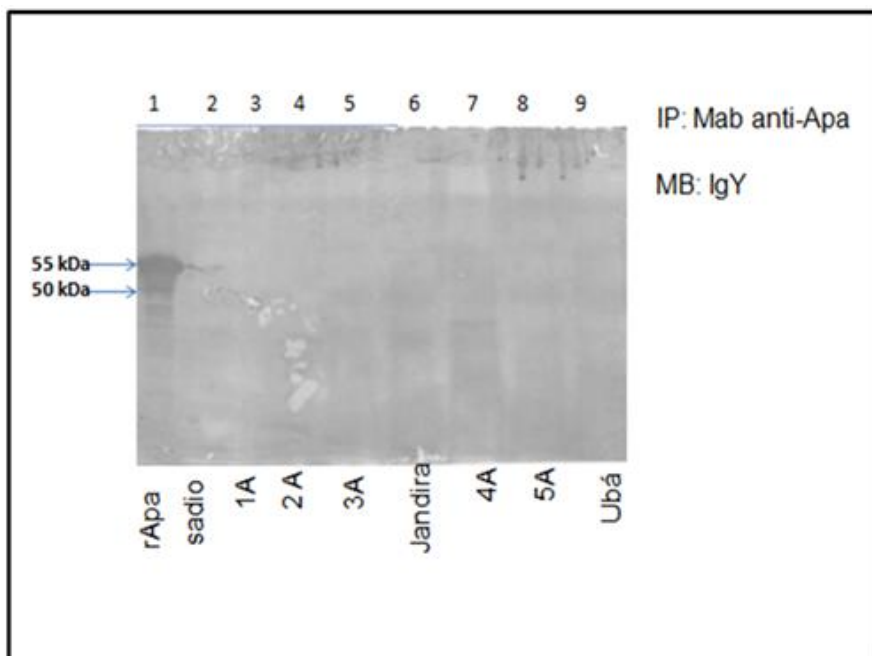
selecionados aleatoriamente, sendo uma bezerra (Jandira) e um animal adulto (Ubá) com diarreia e emagrecimento (suspeito de PTB) foram testados.

A figura 10 mostra a reatividade cruzada dos diferentes soros dos animais que reconheceram antígenos de *M. avium* e *M. bovis*. Os soros dos animais adultos, sem clínica da PTB, reconheceram os antígenos brutos de BCG e *M. avium* mais forte, que o soro do bezerro suspeito em PTB, sendo que o antígeno rAPA foi reconhecido pelo soro do animal 5A e não pelos demais animais. O soro do animal sadio utilizado como controle foi negativo em relação aos antígenos micobacterianos utilizados. O resultado do sorodiagnóstico das vacas suspeitas pode ser falso-positivo para PTB ou TB bovina, devido ao animal ter entrado em contato com micobacteria ambiental, que compartilha antígenos com outras micobactérias, gerando uma resposta imune humoral contra antígenos micobacterianos.



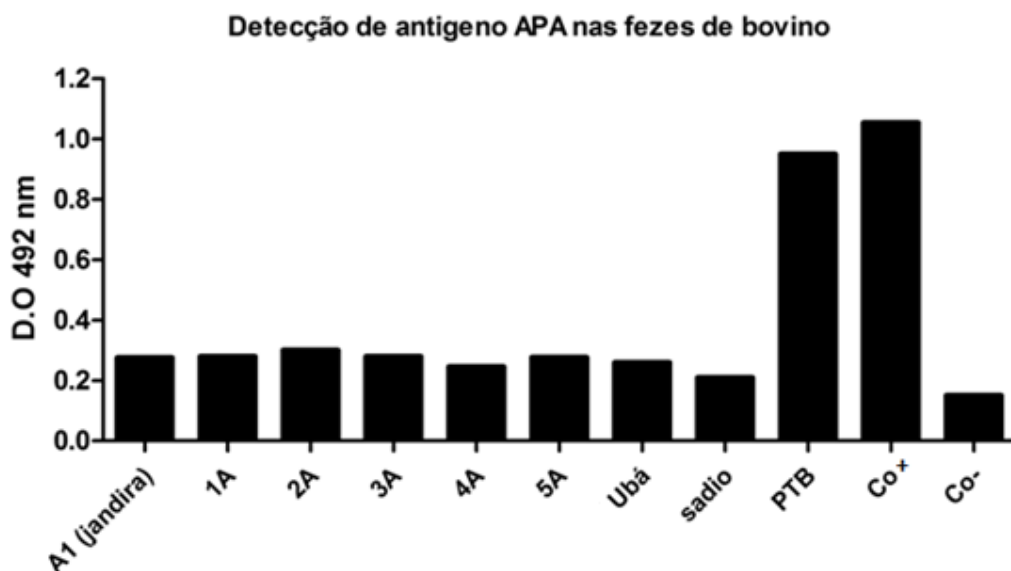
**Figura 10. Reconhecimento de antígenos micobacterianos por soros de bovinos através de ELISA indireto.** As amostras de soros de bovinos (sete vacas adultas e um bezerro com diarreia- Jandira) foram testadas quanto ao reconhecimento de antígenos micobacterianos. Os antígenos foram diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0.05 M na concentração de  $2\mu\text{g/mL}$  e colocados  $50\mu\text{l}$  para cada poço. Como controle negativo foi utilizado soro obtido de animal sadio.

Um caso interessante foi de uma bezerra Jandira que apresentava quadros clínicos de PTB como diarreia e emagrecimento, que causou a morte do animal. Todavia, sua sorologia teve pouca reatividade a diferentes antígenos micobacterianos (Figura 10), isto pode ter ocorrido por se tratar de um bezerro novo com menos de 1 ano da idade, que teve pouca exposição ao ambiente. Além dos resultados negativos da ELISA do soro, o teste de fezes para presença da IgA antimicobacteriana (dados não mostrados), e antígeno APA, também mostraram resultado negativo (figura 11), demonstrando que a infecção intestinal deste bezerro não foi provocada pelas micobactérias. Além disso, o teste histopatológico post-mortem do intestino deste bezerro não detectou nenhuma lesão característica da PTB, como espessamento da mucosa do intestino e presença de granulomas. Todos os outros animais também foram negativos para presença da IgA antimicobacteriana (dados não mostrados), na detecção do antígeno APA- MAP nas fezes do gado bovino por *Western Blotting* (Figura 11) e ELISA sanduíche (Figura 12).



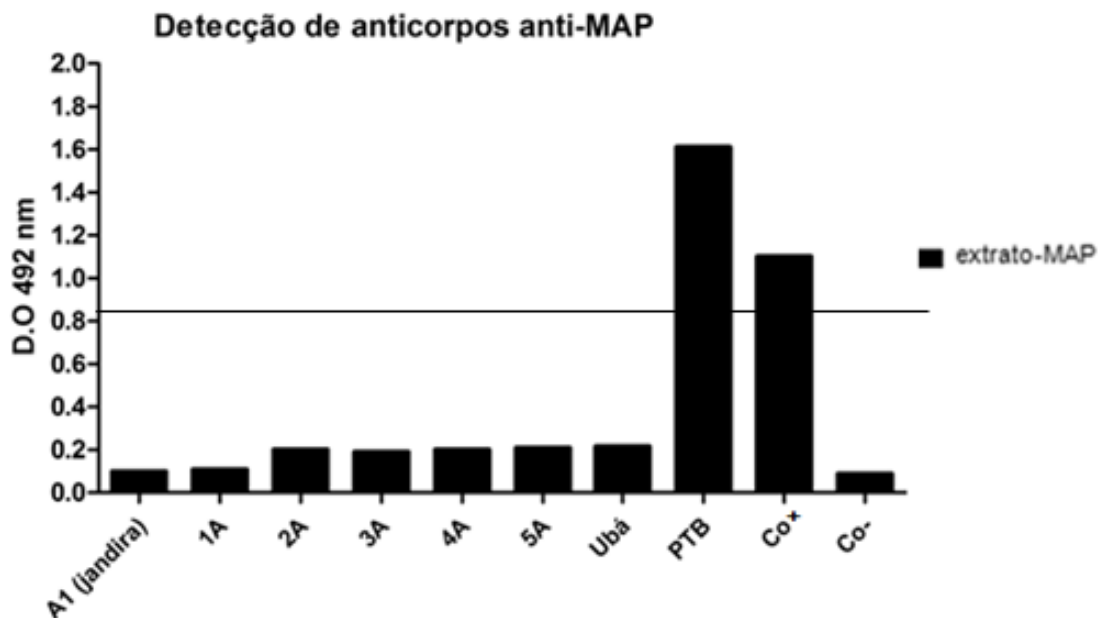
**Figura 11. Imunodeteccção do antígeno APA-MAP em sobrenadante fecal de bovinos através de *Western blotting*.** Amostras de sobrenadantes foram imunoprecipitados com Mab anti-APA. Os precipitados obtidos foram analisados através de *Western blotting*,

utilizando IgY anti-APA para tratamento de membrana. A proteína APA não foi detectada em nenhuma amostra.



**Figura 12. Imunodeteção do antígeno APA-MAP em sobrenadantes de fezes de bovinos, através de ELISA sanduiche.** Os sobrenadantes de fezes das vacas em estudo foram submetidos ao teste ELISA indireto. Co(+) - controle positivo, sobrenadante do meio de cultura 7H9 utilizado para cultivo de *M. avium* que contém a proteína APA secretada pelas micobactérias. Co(-) – controle negativo, meio de cultura 7H9. PTB- sobrenadante de fezes da vaca com PTB.

O resultado negativo do diagnóstico da PTB nos animais testados foi confirmado quando amostras de soros destes animais foram testadas através de teste de Elisa comercial para a detecção dos anticorpos anti-MAP, utilizando o *kit* ELISA Paratuberculosis Antibodies Screening- ID Vet (Figura 13). O ponto de corte para amostras consideradas negativas para anticorpos anti-MAP atendeu a valores iguais ou menores que 60%; para amostras consideradas suspeitas, o ponto de corte figurou entre 60% e 70%; e valores iguais ou maiores que 70% foram considerados como resultados positivos, seguindo recomendações do fabricante.



**Figura 13. Deteccção de anticorpos anti-MAP em soros de bovinos suspeitos de PTB (sorodiagnóstico).** As amostras de soros de bovinos foram testadas quanto ao reconhecimento do extrato purificado de MAP (Kit ID SCREEN®, Paratuberculosis Indirect ELISA kit, ID Vet, França). Linha preta - valores iguais ou maiores que 70% são considerados como resultados positivos de acordo com as recomendações do fabricante. Co(+) - controle positivo do Kit. Co(-) – controle negativo do Kit. PTB- soro do animal com PTB.

Os resultados demonstram que nenhum animal com PTB foi detectado nos rebanhos da região Noroeste do Rio de Janeiro incluídos neste estudo.

## 7. Discussão

Atualmente a grande dificuldade no diagnóstico da PTB está na detecção precoce do seu agente etiológico. O diagnóstico rápido é um ponto importante para o controle da PTB, pois a falta de testes sensíveis o suficiente para detectar animais infectados nos primeiros estágios ou ainda assintomáticos (subclínicos), mas que liberam micobactérias nas fezes transmitindo a doença por via fecal-oral, torna-se um sério obstáculo para a erradicação da doença (COLLINS *et al.*, 2011; KÄSER *et al.*, 2009).

A utilização dos métodos imunquímicos para sorodiagnóstico oferece o diagnóstico rápido, mas a aplicação destes métodos para a PTB é limitada devido às particularidades da patogenia da doença, já que animais nas fases iniciais da infecção não produzem os anticorpos em concentrações detectáveis (FACCIUOLO *et al.*, 2013). Com avanço da doença, ambas as formas da imunidade contra MAP: a resposta humoral (anticorpos) e celular, podem ser detectadas, ajudando no diagnóstico laboratorial da PTB. Durante os estágios finais da doença, ocorre supressão da resposta imune mediada por células antígeno-específicas ou anergia, levando os testes de diagnóstico de imunidade celular a se tornarem negativos e testes sorológicos são menos confiáveis (STABEL, 2000).

Diferentemente da resposta imune, que pode não ser detectável nas fases subclínica e terminal, a presença e crescimento da bactéria nos tecidos intestinais é um fenômeno permanente que está acompanhado pela eliminação de bactéria com fezes. O método bacteriológico de isolamento de MAP nas fezes ou tecido é considerado “padrão ouro” do diagnóstico, mas é um método demorado (2-3 meses) devido ao crescimento lento da micobactéria e contaminação da cultura por outros micro-organismos fecais. Para superar estes obstáculos no diagnóstico da doença, uma abordagem alternativa, baseada na imunodeteção em fezes dos produtos de bactéria (antígenos secretados) ou IgA secretora anti-micobactérianas, pode ser utilizada. Tal abordagem ainda não havia sido utilizada no diagnóstico da PTB, mas com

sucesso foi utilizada no diagnóstico de outras infecções intestinais humanas ou de animais. Testes imunquímicos para detecção dos antígenos de *Helicobacter pylori* (KOLETZKO *et al.*, 2003; KATO *et al.*, 2004; ANTOS *et al.*, 2005), rotavirus (BERNSTEIN *et al.*, 1986), ou *Giardia lamblia* (ROSOFF & STIBBS, 1986), estão sendo utilizados largamente.

Imunoglobulina A secretora (IgA-S) é imunoglobulina predominante na superfície da mucosa intestinal e constitui a primeira linha de defesa imunológica, protegendo a mucosa contra a adesão e invasão por patógenos entéricos (MESTECKY *et al.*, 1999). A infecção do gado por MAP ocorre através da mucosa intestinal, induzindo a produção e secreção de IgA específica. Neste trabalho, através de diferentes metodologias (ultracentrifugação, precipitação por ácido caprílico e proteína A/G agarose) detectamos a presença de IgG e IgA específica anti-micobacteriana nas fezes de animais confirmando a infecção micobacteriana. No entanto, essa abordagem não permite diferenciar infecção por *M. avium* e *M. bovis* (PTB e TB bovina, respectivamente) devido à reação cruzada dos anticorpos policlonais com antígenos de diferentes espécies de micobactéria.

Resultados similares foram encontrados no trabalho de Silvey *et al.*, 2001, onde analisaram o papel da IgA na proteção contra reovirus em camundongos inoculados oralmente com Reovirus tipo 1, que infecta a mucosa intestinal de camundongos. Os pesquisadores detectaram IgA antiviral nas fezes dos camundongos e avaliaram quanto à sua especificidade a diferentes antígenos virais por *Western Blotting*. IgA isolada de amostras fecais do grupo controle reconhecem inespecificamente várias proteínas virais de outros vírus, e a IgA fecal de camundongo exposto a reovirus reconhecem especificamente proteínas do capsídeo deste vírus.

Aumento nos títulos de IgA fecal foi também considerado como um confiável indicador de infecção por rotavírus, mesmo na ausência de partículas virais detectáveis nas fezes (BERNSTEIN *et al.*, 1986).

Outra proteína analisada nesse trabalho, que pode ser alvo de imunodeteção em amostras fecais é APA, um antígeno secretado por várias micobactérias, tais como *M. bovis* (MB), *M. tuberculosis* (MTb) e diferentes



subespécies de *M. avium*. Entretanto, esta proteína está expressa de forma diferente nas bactérias de família *M. tuberculosis* e *M. avium*. A composição de aminoácidos de APA de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (APA-MAP) difere em comprimento com outros ortólogos. APA-MAP possui 368 resíduos, 43 aminoácidos a mais que no antígeno APA do complexo de *M. tuberculosis* (GIOFFRÉ *et al.*, 2009). Ainda, foi demonstrado que em sobrenadante de filtrado de cultura de MAP, o APA-MAP apresenta peso molecular de 50 – 60 kDa, e o APA-MB ou APA-Mtb detectado no sobrenadante de cultura destas micobactérias apresenta um peso de 45 – 47 kDa (GIOFFRÉ *et al.*, 2009).

Nossos trabalhos anteriores (SOUZA *et al.*, 2011) demonstraram que os anticorpos monoclonais produzidos no nosso laboratório podem especificamente reconhecer antígenos APA de diferentes espécies micobacterianas, e foi selecionado um Mab específico para APA-MAP, que não reconheceu o APA-Mtb ou APA-MB, sendo útil para imunodeteção específica de MAP em testes imunohistopatológicos, utilizando tecidos intestinais de vacas com PTB. No presente estudo, foi demonstrado que Mab anti-APA-MAP foi capaz de reconhecer e imunoprecipitar a proteína APA-MAP excretada nas fezes de animais doentes, com PTB confirmada pelos outros métodos do diagnóstico convencional (clínico e laboratorial). Este resultado pela primeira vez revela a presença deste antígeno nas fezes dos animais com PTB, demonstrando que a proteína APA é um novo biomarcador desta doença, sendo que não foi detectado nas fezes dos animais sadios.

Diferentemente da proteína APA-MAP recombinante (50/56 kDa), APA-MAP nativa detectada nas fezes apresenta uma isoforma da proteína glicosilada de 60/75 kDa. A glicosilação da proteína APA foi confirmada através de coloração de glicoproteínas com reagente de Schiff, onde o reagente corou a banda glicosilada e não a proteína APA recombinante.

Estudos supracitados vêm indicando o antígeno APA como promissor para o imunodiagnóstico. Este grande sucesso alcançado nos incentivou a produzir kits diagnósticos para imunodeteção e isolamento de APA das amostras de fezes (Patente depositada – Anexo 1). Além dos anticorpos monoclonais murinos anti-APA-MAP, nós produzimos anticorpos IgY anti-APA em gemas de ovos das galinhas imunizadas pela proteína recombinante APA-

MAP, e utilizamos estes anticorpos para geração de um kit de ELISA sanduiche para detecção da proteína APA em sobrenadantes fecais e um kit para isolamento da APA de fezes através de imunoprecipitação e posterior análise do precipitado por Western blotting.

Os resultados demonstram que os novos kits e procedimentos de preparação de fezes permitem a detecção da proteína APA-MAP nas fezes de animais doentes e suspeitos, mas não em fezes dos animais saudáveis. Foi depositada uma patente “Kit de imunodiagnóstico da paratuberculose através de amostras fecais de ruminantes e processo de tratamento das amostras fecais” baseado nos resultados obtidos.

Para testar a validade do novo método de diagnóstico proposto em comparação com os métodos do sorodiagnóstico convencionais, as amostras de soros e fezes de bovinos coletadas em diferentes fazendas foram testadas por ELISA indireto comercial (kit convencional PARAS-4P ID-Vet Screen®, França) e por ELISA indireto “home-made” frente a diferentes antígenos micobacterianos (APA recombinante, lisado de BCG -wcl-BCG, wcl- *M. avium*).

Os resultados obtidos demonstram uma boa correlação na detecção dos animais infectados utilizando o kit ELISA comercial e nosso novo kit ELISA anti-APA-MAP, sendo que fezes de vacas soropositivas foram também positivas para presença de APA em fezes. Ao contrário, várias vacas que foram negativas de acordo com estes dois testes, apresentaram o resultado positivo no teste do soro contra antígenos de *M. avium* e BCG utilizando nosso “home-made” kit de ELISA indireto. Este resultado demonstra que utilização deste teste não é apropriado para diagnóstico da PTB devido à forte reatividade cruzada dos anticorpos do soro com epítomos antigênicos compartilhados pelas diferentes espécies de micobactérias, incluindo espécies ambientais que podem induzir a resposta imune anti-micobacteriana nos animais saudáveis, sem PTB.

Apesar da necessidade de experimentos adicionais para confirmar utilidade da nova metodologia proposta neste trabalho para detecção de animais com PTB na fase inicial e subclínica da doença, essa metodologia (kit proposto) apresenta as seguintes vantagens sobre os demais métodos de

diagnóstico da paratuberculose que existem atualmente: i) utiliza material de coleta fácil (fezes do animal vivo); ii) elimina a necessidade do sacrifício de animais para a realização de exames histológicos post-mortem; iii) utiliza métodos imunológicos (ELISA, *Western blotting*) que são rápidos e baratos. Nossos dados preliminares permitem sugerir algumas vantagens adicionais, como - iv) diagnóstico preciso da doença pelo menos em estágio clínico v) e redução da possibilidade de ocorrência de resultados falsos, tais como falsos-positivos e falsos-negativos, frequentemente observados no sorodiagnóstico que ainda devem ser confirmadas em experimentos de avaliação de maior número dos animais.

No futuro, pretendemos melhorar o método de diagnóstico desenvolvido. A possibilidade de detecção do antígeno de MAP em fezes como um biomarcador da PTB abre perspectivas de express-diagnóstico dessa doença, de maneira similar ao diagnóstico atual da infecção por *H. pylori* ou rotavírus em fezes. Para melhorar o diagnóstico imunoenzimático da infecção por *H. pylori*, os testes imunocromatográficos para detecção de antígenos nas fezes foram lançados no comércio recentemente. Estes testes são de execução fácil e permitem a obtenção de resultados em poucos minutos, apresentando sensibilidade e especificidade semelhantes às observadas com os testes imunoenzimáticos (KATO *et al.*, 2004; ANTOS *et al.*, 2005). Para diagnóstico das infecções por Rotavírus também foi desenvolvido o kit de express-diagnóstico - O Rotavírus Tira Látex (Bioeasy Diagnóstica), que é um teste rápido, simples e muito sensível para detectar a presença de Rotavírus nas fezes. Este teste utiliza anticorpos monoclonais específicos unidos a microesferas coloridas que são capturadas durante sua migração através de uma membrana na qual também se tem imobilizado anticorpos específicos. Todas essas metodologias serão aplicadas para produção de novos kits diagnósticos para PTB.

## 8. Conclusões

- 1) Foram desenvolvidas novas abordagens para imunodiagnóstico da PTB baseadas na detecção e identificação de antígenos de MAP ou sIgA em fezes;
- 2) O antígeno APA – MAP, que está sendo excretado nas fezes de animais com PTB numa forma glicosilada de 60/70 kDa, pode ser considerado um biomarcador da doença e utilizado com alvo para imunodiagnóstico;
- 3) A imunodeteção do antígeno APA-MAP nas fezes do gado é uma abordagem nova e promissora para o diagnóstico fecal da PTB, e as ferramentas e metodologia para novos testes imunoquímicos foram desenvolvidos neste trabalho.
- 4) Foi desenvolvido um novo Kit de imunodiagnóstico (baseado num par de anticorpos anti-APA: um anticorpo monoclonal e IgY produzido em ovos de galinha) e estabelecido o processo de preparo de amostras fecais para imunoensaios: ELISA, imunoprecipitação e *Western blotting*;
- 5) Foi desenvolvido um novo método de imunodiagnóstico da PTB baseado na detecção de IgA fecal contra antígenos específicos de MAP o que pode ser útil para diferenciar a PTB de outras doenças intestinais, mas não permite diferenciação da PTB e forma intestinal da tuberculose nos ruminantes.

## 9. Referências

ABBAS M, MUNIR M, KHALIQ SA, UL HAQ MI, KHAN MT AND QURESHI ZA. 2011. Detection of Paratuberculosis in Breeding Bulls at Pakistani Semen Production Units: A Continuous Source of Threat. ISRN Veterinary Science,1-4.

ACYPRESTE C.S., JULIANO R.S., RIVEIRA F.E.B., SILVA L.A.F., FIORAVANTI M.C.S. & DIAS-FILHO F.C. 2005. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação. Ciênc. Anim. Bras. 6(1):55-59.

AGRAWAL G, BORODY TJ, CHAMBERLIN W. 2014. 'Global warming' to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. Future Microbiol. 9(7):829-32.

AHA Animal Health Australia  
2012. [www.animalhealthaustralia.com.au/](http://www.animalhealthaustralia.com.au/) (acessado 01.03.15).

AL-GHAMDI GM. 2013. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Camels; Clinical Aspects and Control Suggestions. Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. 5(1):11–15.

ALMEIDA CM, KANASHIRO MM, RANGEL FILHO FB, MATA MF, KIPNIS TL, DA SILVA WD. 1998. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. Vet Rec. 21;143(21):579-84.

ANTOS D, CRONE J, KONSTANTOPOULOS N, KOLETZKO S. 2005. Evaluation of a novel rapid one-step immunochromatographic assay for detection of monoclonal *Helicobacter pylori* antigen in stool samples from children. J Clin Microbiol.43:2598-601.

ATREYA R, BÜLTE M, GERLACH GF, GOETHE R, HORNEF MW, KÖHLER H, MEENS J, MÖBIUS P, ROEB E, WEISS S; ZooMAP Consortium 2014.

Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Int J Med Microbiol.* 304(7):858-67.

AUTSCHBACH F, EISOLD S, HINZ U. 2005. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut.*54:944–9

AYELE WY, MACHÁ KOVÁ M, PAVLÍK I. 2001. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet Med Czech;* 46: 205-24.

BAKKER D., WILLEMSSEN P.T.J., ZIJDERVELD F.G VAN. 2000. Paratuberculosis recognized as a problem at last: a review *Vet. Q.* 22: 200–204.

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

BASTIDA F, JUSTE RA .2011. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J. Immune Based Ther. Vaccines.* 9:8.doi:10.1186/1476– 8518– 9–8.

BERGHAUS, R.D., FARVER, T.B., ANDERSON, R.J., JARAVATA, C.C., GARDNER, I.A., 2006. Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis on large California dairies. *J. Dairy Sci.* 89: 963– 970.

BARKEMA, H.W., HENDRICK, S., DE BUCK, J., KAPLAN, G.G., RIOUX, K., 2010. Crohn's disease in humans and Johne's disease in cattle-linked diseases? In: Krause, D., Hendrick, S. (Eds.), *Zoonotic Pathogens in the Food Chain.* CAB International; 197–213.

BEARD PM., DANIELS MJ., HENDERSON D., PIRIE A., RUDGE K., BUXTON D., RHIND S., GREIG A., HUTCHINGS MR., MCKENDRICK I., STEVENSON K., SHARP JM. 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39:1517–21.

BEGG D.J. & WHITTINGTON R.J. 2008. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. J.* 176:129-145.

BEHR M A. & COLLINS D.M. 2010. Paratuberculosis: Organism, disease, control. CAB international, Cambridge. 375p.

BENEDICTUS, G.; VERHOEFF, J.; SCHUKKEN, Y. H.; HESSELINK, J.W. 2000. Dutch paratuberculosis programme history, principles and development. *Veterinary Microbiology.*77:399-413.

BENEDICTUS, G., DIJKHUIZEN, A., AND STELWAGEN, J. 1987. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.*121: 142–146.

BENNETT R., MCCLEMENT I., MCFARLANE I. 2012. Modelling of Johne's disease control options in beef cattle: A decision support approach. *Livestock Sci.* 146(2–3): 149–159.

BERNSTEIN, D. I.; ZIEGLER, J. M.; WARD, R. L. 1986. Rotavirus fecal IgA antibody response in adults challenged with human rotavirus. *J Med Virol.* 20:297-304.

BIET, F., BAY, S., THIBAUT, V.C., EUPHRASIE, D., GRAYON, M., GANNEAU, C., LANOTTE, P., DAFFQ, M., GOKHALE, R., ETIENNE, G., REYRAT, J.M., 2008. Lipopentapeptide induces a strong host humoral response and distinguishes *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from *M. avium* subsp. *avium*. *Vaccine* 26: 257-268.

BORODY T.J., BILKEYS., WETTSTEIN AR., LEIS S, PANG G., TYE S .2007. Anti- mycobacterial therapy in Crohn's disease heals mucosa with longitudinal scars. Dig. Liver Dis. 39(5):438–44.

BUERGELT C.D., DONOVAN G.A., WILLIAMS J.E. 2004: Identification of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis by polymerase chain reaction in blood and semen of a bull with clinical paratuberculosis. The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine. 2: 130–134.

CARTER, G. R., 1988. Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária. São Paulo: Roca, p 249.

CARVALHO I.A. 2008. Isolamento e detecção molecular de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) em rebanhos bovinos leiteiros na região de Viçosa, MG. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, UFV, Viçosa.

CARVALHO I.A., SILVA V.O., VIDIGAL P.M.P., SILVA-JUNIOR A. & MOREIRA M.A.S. 2012. Genetic evaluation of IS900 partial sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Brazilian isolates from bovine milk. Trop. Anim. Health Prod. S11250-012-0117-1. (Online).

CHAUDHRY ZI., KHAN FA., BADAR S., SHAHID M. 2009. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Domestic Ruminants in Lahore, Pakistan. Pak J Zool.41(2):160.

CHI J, VANLEEUEWEN JA, WEERSINK A, KEEFE GP. 2002: Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. Prev Vet Med. 55:137–153.

CHIODINI, R. J. 1989. Crohn's disease and the Mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. Clin. Microbiol. Rev. 2:90-117.



CHIODINI, R. J., H. J. VAN KRUININGEN, AND R. S. MERKAL. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74:218–262.

CHO J., TAVER L.W., SCHUKKEN Y.H., GOMEZ M.I., SMITH R.L., LU Z. & GROHN Y.T. 2012. Economic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 95(4):1855-1872

CLICK RE, VAN KAMPEN CL. 2010. Assessment of Dietzia subsp. C79793-74 for treatment of cattle with evidence of paratuberculosis. *Virulence.* 3:145-55.

COCITO, C., GILOT, P., COENE, M., DE KESEL, M., POUPART, P., VANNUFFEL, P. 1994. Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 328-345.

COLLINS M.T., GARDNER I.A., GARRY F.B., ROUSSEL A.J. & WELLS S.J. 2006. Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229: 1912-1919.

COLLINS D.M. 2001. (Eds), Paratuberculosis: Organism, disease, control. CAB International, Cambridge. 375p.

COLLINS, M. T., G. LISBY, C. MOSER, D. CHICKS, S. CHRISTENSEN, M. REICHELDERFER, N. HOIBY, B. A. HARMS, O. O. THOMSEN, U. SKIBSTED, AND V. BINDER. 2000. Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J. Clin. Microbiol.* 38:4373– 4381.

COSTA, J.C.M.; PIERI, F.A.; SOUZA, C.F.; ESPESCHIT, I.F.; FELIPPE, A.G.; SANTOS, G.M.; TOBIAS, F.L.; SILVA JÚNIOR, A.; MOREIRA, M.A.S. 2010. Levantamento sorológico de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 62:1491-1494.

CROHN B., GINZBURG L. & OPPENHEIMER G. 1932. Regional ileitis, a pathological and clinical entity. J. Am. Med. Assoc. 99:1323-1329.

CUNHA P.H.J., MARTINS A.F., FIORAVANTI M.C.S., BRITO L.A.B., ARAÚJO E.G., SILVA L.A.F., RABELO R.E. & JARDIM E.A.G.V. 2003. Avaliação microbiológica e anatomopatológica da paratuberculose bovina: relato de caso. Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Botucatu, p.118.

DACORSO-FILHO P., CAMPOS I.O.N., FARIA J.F. & LANGENEGGER J. 1960. Doença de Johne (paratuberculose) em bovinos nacionais. Arqs Inst. Biol. Anim., Rio de J., 3:129-139.

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. 2012. Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes. Trop. Anim. Health Prod. 44:1-5.

DIAS L.D., ASSIS R.A., DIAS G.C.D., JUNIOR A.C.O., CARVALHO A.V.A., PINTO F.F., GONÇALVES L.A., MARTINS N.E., PARREIRAS P.M. & NASCIMENTO R.P. 2002. Isolamento do *Mycobacterium paratuberculosis* a partir de fezes de bovinos suspeitos de paratuberculose. Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, Anais eletrônicos, Belo Horizonte, MG. Disponível em <<http://www.ufmg.br/prpq/xisic/sic2002/resumos/1w2w44.html>> Acesso em 13 mai. 2012.

DONAT K., SCHLOTTER K., ERHARDT G., BRANDT H. R. 2014. Prevalence and control measures within the herd influence the performance of ELISA tests. Veterinary Record.174:119.

DRIEMEIER D., CRUZ C.E.F., GOMES M.J.P., CORBELLINI L.G., LORETTI A.P. & COLODEL E.M. 1999. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 19(3/4):109-115.

DUPONT O. 1915. Jornal do Comércio do Rio de Janeiro de 5.11.1915.

EDA S, BANNANTINE JP, WATERS WR, MORI Y, WHITLOCK RH, SCOTT MC, SPEER CA. 2006. A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin Vaccine Immunol*; 13: 837-44.

ELLINGSON JL, ANDERSON JL, KOZICZKOWSKI JJ, RADCLIFF RP, SLOAN SJ, ALLEN SE. 2005. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J Food Prot.* 68(5):966–72.

ERIKSEN, L., LOFTAGER, M., BOGH, H. O., LIND, P., NANSEN, P. 1996. Local and systemic immune response to *Ascaris suum* in pig. *Vet. Immunol. Immunophatol.* 54, 209.

FACCIUOLO A., KELTON D. F., MUTHARIA L. M. 2013. Novel secreted antigens of *Mycobacterium paratuberculosis* as serodiagnostic biomarkers for Johne's disease in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 20:1783–1791 [10.1128/CVI.00380-13](https://doi.org/10.1128/CVI.00380-13).

FARIA A.C.S., SCHWARZ D.G.G. , CARVALHO I.A. , ROCHA B.B. , CASTRO K.N. DE CARVALHO, SILVA M.R., MOREIRA M.A.S. 2014. *Short communication: Viable Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail artisanal Coalho cheese from Northeastern. Brazil *Journal of Dairy Science* Volume 97, Issue 7, Pages 4111–4114. [doi:10.3168/jds.2013-7835](https://doi.org/10.3168/jds.2013-7835)

FERREIRA R., FONSECA L.S. & LILENBAUM W. 2002. Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Letters Appl. Microbiol.* 25:173-175.

FERREIRA R., RISTOW P., MARASSI C.D., ROCHA F., OELEMANN W.M.R., RODRIGUES A.B.F., SANTOS A.S.O., CARVALHO E.C.Q., CARVALHO C.B.,

FONSECA L.S. & LILENBAUM W. 2003. Paratuberculose bovina em fazenda de produção leiteira em Resende, Rio de Janeiro, Brasil. 22º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis, SC. (CD-Rom).

FONSECA L.F.L., OLIVAL A.A., PEREIRA C.C., HEINEMANN M.B., RICHTZENHAIN L.J. & SANTOS M.V. 2000. Identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. Arqs Faculd. Vet. UFRGS 28:51-56.

FRIDRIKSDOTTIR V, GUNNARSSON E, SIGURDARSON S, GUDMUNSDOTTIR KB. 2000,: Paratuberculosis in Iceland: epidemiology and control measures, past and present. Vet Microbiol 77:263-267.

GARRIDO JM, ADURIZ G, JUSTE RA, GEIJO MV. 2000. Los métodos de diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno. Bovis, 93: 49-61.

GERAGHTY T., GRAHAM D. A., MULLOWNEY P., MORE SJ. 2014. A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. [PrevVetMed](#).116:1-11.

GILARDONI, L.R., PAOLICCHI, F.A. & MUNDO S.L. 2012. Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. Rev. Argent. Microbiol. 44: 201-215.

GIOFFRE´A., ECHEVERRI´A-VALENCIA, G., ARESE , A. , MORSELLA , C., GARBACCIO , S. , DELGADO , F., ZUMA´RRAGA , M., PAOLICCHI , F., CATALDI , A., ROMANO, M.I., 2009. Characterization of the Apa antigen from *M. avium* subsp. paratuberculosis: A conserved Mycobacterium antigen that elicits a strong humoral response in cattle. Veterinary Immunology and Immunopathology, 255:150 – 165.

GLANEMANN B., SCHONENBRUCHER H., BRIDGER N., ABDULMAWJOOD A., NEIGER R., BULTEM. 2008. Detection of *Mycobacterium*

*avium* subspecies *paratuberculosis*-specific DNA by PCR in intestinal biopsies of dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 22: 1090–1094.

GOMES M.J.P., DRIEMEIER D., RIBEIRO V.R., WUNDER JR. E.A., ASANOME W., LANZON L.F. & WALD V.B. 2002. Doença de Johne: Isolamento do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) em um rebanho leiteiro infectado na região Sul do Brasil. *Acta Scient. Vet.* 30(2):113-118.

GRANT I.R., WILLIAMS A.G., ROWE M.T., MUIR D.D. 2005: Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 2853–2861.

GRANT IR, BALL HJ, NEILL SD, ROWE MT. 1996. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 62: 631-636.

GREIG, A., STEVENSON, K., HENDERSON, D., PEREZ, V., HUGHES, V., PAVLIK, I., HINES, M. E., MCKENDRICK, I., SHARP, J. M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37:1746 – 1751.

GWOZDZ JM.2010. Paratuberculosis (Johne's Disease). Australian and New Zealand Standard Diagnostic Procedures August 2010.

HASONOVA, L. AND PAVLIK, I. 2006. Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: A review. *Vet. Med.* 51: 193–211.

HARRIS, N.B., BARLETTA, R.G. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Review.*14(6): 489 -512.

HENDRICK, S.H., KELTON, D.F., LESLIE, K.E., LISSEMORE, K.D., ARCHAMBAULT, M., AND DUFFIELD, T.F. 2005. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227: 1302–1308.

HERMEL S.R. (1998): Testing for Johne's. *Angus J.*, 3, 194– 202.

HERMON-TAYLOR J. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease. *Gut.* 49:755-756.

HORN, C.; PESCHER, P.; ROMAIN, F.; MARCHAL G., 1996. Characterization of murine monoclonal antibodies specific for the 45/47 kDa antigen complex (APA) of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* and BCG. *Journal of Immunological Methods.* 197: 151- 159.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2012. Disponível em:  
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.shtm> Acesso em: 20. jan .2015.

JOHNE N. & FROTHINGHAM I. 1895. Ein eigentümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Dtsch. Z. Tiermed.* 21:438- 454.

JOHNSON-IFEARULUNDU, Y.J., KANEENE, J.B., SPRECHER, D.J., GARDINER, J.C., AND LLOYD, J.W. 2000. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 46: 171–181.

JUBB K.V.F., KENNEDY P.C. & PALMER N.C. 2007. *Pathology of Domestic Animals.* Vol.2, 5<sup>a</sup> ed. Saunders Elsevier, Edinburgh.

JUSTE RA, ELGUEZABAL N, PAVÓN A, GARRIDO JM, GEIJO M, SEVILLA I, CABRIADA JL, TEJADA A, GARCÍA-CAMPOS F, CASADO R, OCHOTORENA I, IZETA A. 2009. Association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in blood and cellular and humoral immune response in inflammatory bowel disease patients and controls. *Int.J.Infect.Dis.*13:247–254.

JUSTE RA, CASAL J.1993. An economic and epidemiologic simulation of different control strategies for ovine paratuberculosis. *Prev Vet Med.* 15: 101–05.

KATO S, OZAWA K, OKUDA M, NAKAYAMA Y, YOSHIMURA N, KONNO M, et al.2004. Japan Pediatric Helicobacter Study Group. Multicenter comparison of rapid lateral flow stool antigen immunoassay and stool antigen enzyme immunoassay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *Helicobacter.*9:669-73.

KENNEDY, A. E., DA SILVA, A. T., BYRNE, N., GOVENDER, R., MACSHARRY, J., O'MAHONY, J., & SAYERS, R. G.2014. The Single Intradermal Cervical Comparative Test Interferes with Johne's Disease ELISA Diagnostics.*Frontiers in Immunology.* 5, 564. doi:10.3389/fimmu.2014.00564.

KENNEDY D., BENEDICTUS G. 2001: Control of *Mycobacterium paratuberculosis* in agricultural species. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 20, 151–179.

KHAN FA., CHAUDHRY ZI., ALI MI., KHAN S., MUMTAZ N., AHMAD. 2010. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in tissue samples of cattle and buffaloes. *Trop. Anim Health Prod.* 42:633–638. DOI 10.1007/s11250–009–9467–8.

KHOL JL, BAUMGARTNER W. 2012. Examples and suggestions for the control of paratuberculosis in European cattle. *Jpn. J. Vet. Res.* 60: 1–7.

KINOSHITA, K., HARIGAI, M., FAGARASAN, S., MURAMATSU, M. & HONJO, T. 2001. A hallmark of active class switch recombination: transcripts directed by I promoters on looped-out circular DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12620–12623.

KLANICOVA B., SLANA I., ROUBAL P., PAVLIK I, KRALIK P. 2012. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods *International Journal of Food Microbiology*, 157 , pp. 150–155.

KOLETZKO S, N KONSTANTOPOULOS, D BOSMAN, A FEYDT-SCHMIDT, A VAN DER ENDE, N KALACH, J RAYMOND, H RÜSSMANN., 2003. Evaluation of a novel monoclonal enzyme immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool from children *Gut*; 52:804–806.

KREEGER, J. M. 1991. Ruminant paratuberculosis—a century of progress and frustration. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3:373–383.

KRUININGEN VAN, H.J. 1999. Lack of support for a common etiology in Johne's disease of animals and Crohn's disease in humans. *Inflammatory Bowel Diseases*. 5:183-191.

LAMBETH C, REDDACLIFF LA, WINDSOR P, ABBOTT KA, MCGREGOR H AND WHITTINGTON RJ.2004. Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Aust. Vet. J.* 82:504 – 508.

LAMBRECHT, R. S., AND M. T. COLLINS. 1993. Inability to detect mycobactin in *Mycobacteria*-infected tissues suggests an alternative iron acquisition mechanism by *Mycobacteria* in vivo. *Microb. Pathog.* 14:229-238.

LARANJA-DA-FONSECA, L. F.; SANTOS, M. V; PEREIRA, C. C., OLIVAL, A. A.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L. J. 1999. Identificação da presença



de anticorpos contra *M. paratuberculosis* em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico. v.66, p. 122.

LARSEN A.B., MERKAL R.S., CUTLIP R.C.1975: Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res., 36, 255–257.

LILENBAUM W., MARASSI C.D. & OELEMANN W.M.R. 2007. Paratuberculosis: An update. Braz. J. Microbiol. 38:580-590.

LOMBARD JE. 2011. Epidemiology and economics of paratuberculosis. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 27(3):525–35. doi: 10.1016/j.cvfa.2011.07.012

LOWE, A.M., YANSOUNI, C.P., BEHR, M.A., 2008. Causality and gastrointestinal infections: Koch Hill, and Crohn's. Lancet Infect. Dis. 8: 720–726.

LU Z., SCHUKKEN YH., SMITH RL., GRÖHN YT .2013a. Using vaccination to prevent the invasion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds: a stochastic simulation study. Prev. Vet. Med.110(3– 4):335–45.

MAPA, Ministério de agricultura, pecuária e abastecimento, INSTRUÇÃO NORMATIVA No 50, DE 24 DE SETEMBRO DE 2013. Brasil, 2013.

MANNING, E.J.; COLLINS, M.T. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Revue Scientifique et Technique. 20:133-150.

MANTIS, N.J., ROL, N., AND CORTHÉSY. 2011. B.Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 4:603–611.

MCDONALD, W. L., K. J. O'RILEY, C. J. SCHROEN, AND R. J. CONDRON. 2005. Heat inactivation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1785–1789.

MCKENNA S.L.B., KEEFE G.P., TIWARI A., VANLEEUVEN J. & BARKEMA H.W. 2006. Johne's disease in Canada. Part II. Disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Can. Vet. J.* 47:1089-1099.

MEDEIROS J.M.A., GARINO-JÚNIOR F., MATOS R.A.T., COSTA V.M.M. & RIET-CORREA F. 2012B. Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semiárido paraibano. *Pesq. Vet. Bras.* 32(8):697-700.

MERKAL, R. S., A. B. LARSEN, AND K. E. KOPECKY. 1968. Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 29:1533–1538.

MERKAL, R.S. Paratuberculosis. 1984. In: KUBICA, G.P., WAYNE, L.G. The mycobacteria. A sourcebook. New York and Basel: Maree Dekker, Inc., cap. 50. p. 1237-1249.

MESTECKY, M. W., RUSSELL, C., O ELSON. 1999. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut* .44:2-5.

MICHETTI P, MAHAN MJ, SLAUCH JM, MEKALANOS JJ, NEUTRA MR. 1992. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun.* 60:1786–1792.

MORTIER RA, BARKEMA HW, WILSON TA, SAJOBI TT, WOLF R. 2014 Dose dependent interferon-gamma release in dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol* 161: 205–210.

MOTA P.M.P.C., PIRES P.S., ASSIS R.A., SALVARANI F.M., LEITE R.M.H., DIAS L.D., LEITE R.C., LOBATO F.C.F., GUEDES R.M.C & LAGE A.P. 2009. Paratuberculosis in a dairy Gyr herd in a state of Paraíba, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 29(9):703-706.

MOTA R.A., PINHEIRO-JUNIOR J.W., GOMES M.J.P., PEIXOTO R.M., MAIA C.L., BRITO M.F., CHIES J.A.B., SNEL G.G.M., BERCHT S. & JUFFO G.D. 2007. Paratuberculose em um rebanho leiteiro no Estado de Pernambuco, PE. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 74(2):73-79.

MOWAT AM, AGACE WW. 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* . 14:667–85. doi:10.1038/nri3738

MUNIR MT, MUNIR AR, MURTAZ UL HASSAN, ABUBAKAR M. 2014. Epidemiology, diagnosis and control options of johnes's disease in endemic situations. *Res. J. Vet. Pract.* 2 (5): 84 – 90.

MUTHARIA L. M., MORENO W., RAYMOND M. 1997. Analysis of culture filtrate and cell wall-associated antigens of *Mycobacterium paratuberculosis* with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*65: 387–394.

NAKASE H, TAMAKI H, MATSUURA M, CHIBA T, OKAZAKI K. 2011. Involvement of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in TNF- $\alpha$  production from macrophage: possible link between MAP and immune response in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*; 17: E140-E142 [PMID: 21990211 DOI: 10.1002/ibd.21750.

NAKASE, H., NISHIO, A., TAMAKI, H., MATSUURA, M., ASADA, M., CHIBA, T., OKAZAKI, K. 2006: Specific Antibodies Against Recominant Protein of Insertion Element 900 of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Japanese Patients With Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 12: 62-69.

NAKAJIMA M., MAIA F.C.L. & MOTA P.M.P.C. 1991. Diagnóstico da paratuberculose em Minas Gerais. Anais 4º Simpósio Brasileiro em Micobactérias, Bauru, SP, Resumo 67.

NASER SA, SAGRAMSINGH SR, NASER AS, THANIGACHALAM S. 2014. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. World J Gastroenterol. 20(23): 7403-7415.

NASER S., GHOBRIAL, G., ROMERO, C. & VALENTINE J.F 2004, GHOBRIAL G, ROMERO C, VALENTINE J. Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's Disease. The Lancet;364:1039–44.

NIELSEN S.S. 2009. Use of diagnostics for risk-based control of paratuberculosis in dairy herds . In Practice 31: 150-154.

NIELSEN S.S. & TOFT N. 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon g assay ad fecal culture techniques. Vet. Microbiol. 129:217-235.

OIE 2014. World Organization for Animal Health. Disponível em [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.11\\_PARATB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf).

OIE 2010. World Organization for Animal Health. Disponível em <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.11\\_ ARATB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_ARATB.pdf)> Acessado em 10 Jan. 2015.

OKURA H., TOFT N. & NIELSEN S.S. 2012. Occurrence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk at dairy cattle farms: A systematic review and meta-analysis. Vet. Microbiol. 157:253-263.

OLIVEIRA D.M., RIET-CORREA F., GALIZA G.J.N., ASSIS A.C.O., DANTAS A.F.M., BANDARRA P.M. & GARINO F. 2010. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 30(1):67-72.

OTT SL, WELLS SJ, WAGNER BA. 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med*;44:1-7.

OTTE M.J., CHILONDA P. 2000: Animal Health Economics: An Introduction. Animal Production and Healthy Division (AGA), FAO, Rome, Italy. 12 pp.

PAOLICCHI FA, ROMANO MI. Paratuberculosis. In: Stanchi NO. 2007. editor. *Microbiología Veterinaria*, 2nd edition. Buenos Aires, Intermédica, p. 425-31.

PATTON E., WHEELER R.L. 2010. Report of the Committee on Johne's Disease and of the National Johne's Working Group. <http://www.usaha.org/Portals/6/Reports/2010/report-jd-2010.pdf> (accessed 01.09.12).

PILLAI S., NETRAVALI I.A., CARIAPPA A., MATTOO H. 2012. Siglecs and immune regulation. *Annu. Rev. Immunol.* 30:357-392.

PNCEBT 2006. Manual Técnico. Programa Nacional de Controle e Erradicação da brucelose e da Tuberculose Animal, Brasília. 184p.

PORTUGAL M.A.S.C., PIMENTEL J.N., SALIBA A.M., BALDASSI L. & SANDOVAL E.F.D. 1979. Ocorrência de paratuberculose no Estado de Santa Catarina. *Biológico*, São Paulo, 4:19-24.

PRADHAN, A.K., MITCHELL, R.M., KRAMER, A.J., ZURAKOWSKI, M.J., FYOCK, T.L., WHITLOCK, R.H., SMITH, J.M., HOVINGH, E., VAN KESSEL, J.S., KARNS, J.S., SCHUKKEN, Y.H., 2011. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in a longitudinal study of three dairy herds. *J. Clin. Microbiol.* 49, 893-901.

RAIZMAN, E.A., ESPEJO, L.A., WELLS, S.J. 2011. Long-term survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in fecal samples obtained from naturally infected cows and stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  and  $-70^{\circ}\text{C}$ . *Vet. Med. Int.* 2011:341691.

RAIZMAN, E.A., FETROW, J., AND WELLS, S. 2009. Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *J. Dairy Sci.* 92: 4929–4936.

RAMOS, E.T., POESTER F.P., CORREA B.L., OLIVEIRA S.J., RODRIGUES N.C. & CANABARRO C.E. 1986. Paratuberculose em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Hora Vet. Porto Alegre*, 6(34):28-32.

RISTOW P., MARASSI C.D., RODRIGUES A.B.F., OELEMANN W.M., ROCHA F., SANTOS A.S.O., CARVALHO E.C.Q., CARVALHO C.B., FERREIRA R., FONSECA L.S. & LILENBAUM W. 2007. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. *Vet. J.* 174(2):432-434.

RIVEIRA F.E.B. 1996. Levantamento sorológico utilizando-se a técnica ELISA em rebanhos apresentando problemas reprodutivos. I. Enterite paratuberculose. *Anais Encontro de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário do Cone Sul. Campo Grande, MS*, p.20-22.

ROBBE-AUSTERMAN S. 2011. Control of paratuberculosis in small ruminants. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 27(3):609-620.

RODRIGUES A.B.F. 2005. Paratuberculose em bovinos: análises anátomo-clínica, bacteriológica, imunohistoquímica e pela reação em cadeia da polimerase. Tese de Doutorado no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ. 93p.

ROSOFF, J.; STIBBS, H.1986. Isolation and Identification of a *Giardia lamblia*-Specific Stool Antigen (GSA 65) Useful in Coprodiagnosis of Giardiasis. *J. Clin Microbiol.* 23:905-910.

ROSSEELS, V. & HUYGEN, K. 2008. Vaccination against paratuberculosis. *Expert Review of Vaccines*. 7: 817-832.

ROUSSEL, A.J.; FOSGATE, G.T.; MANNING, E.J.B. et al. 2007. Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230:890-895.

SANDERSON, J. D., M. T. MOSS, M.L.V. TIZARD, AND J. HERMONTAYLOR. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissues. *Gut* 33:890–896.

SÁ L.M&PINHEIRO JUNIOR J.W. 2012. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo *M. avium paratuberculosis* em rebanho leiteiro da microrregião de Garanhuns- Pernambuco, Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* vol.33 no.3.

SANTOS J.A. & SILVA N.I. 1956. Sobre a 1ª observação de paratuberculose no Brasil. *Bolm Soc. Bras. Med. Vet.* 24:5-14.

SECHI LA, SCANU AM, MOLICOTTI P, et al. 2005. Detection and Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. *Am J Gastroenterol.* 100(7):1529-36.

SECOTT TE., LIN TL., WU CC., 2004. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect Immun.* Jul;72(7):3724-32.

SEITZ S.E., HEIDER L.W., HUESTON W.D., BECH-NIELSON S., RINGS D.M., SPANGLER L. 1989: Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*194: 1423–1426.

SHANKAR, H., S.V. SINGH, P.K. SINGH, A.V. SINGH, J.S. SOHAL AND R.J. GREENSTEIN, 2010. Presence, characterization and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk and milk products in India by culture, PCR and PCR-REA methods. *Int. J. Infect. Dis.* 14: e121-e126.

SHERMAN, D. M., R.J.F. MARKHAM, AND F. BATES. 1984. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. JAVMA. 185:179–182.

SILVA E.B. 2005. Diagnóstico de paratuberculose em bovinos de corte do estado do Pará-Brasil. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Castanhal. 60p.

SILVA N.M. & PIZELLI G.N. 1961. Estudos sobre a paratuberculose. I. Diagnóstico de um caso da doença. Arqs Inst. Biol. Anim., Rio de J. 4:169-173.

SILVEY, K. J., HUTCHINGS, A. B., VAJDY, M. PETZKE, M. M., AND NEUTRA, M. R. 2001. Role of immunoglobulin A in protection against reovirus entry into murine Peyer's patches. J. Virol. 75, 10870–10879.

SINGH SV., SINGH PK., SINGH AV., GUPTA S., CHAUBEY KK., SINGH B., KUMAR A., SRIVASTAV A., SOHAL JS 2013. Bio-burden and bio-type profiles of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in suspected population of domestic livestock in India. International Journal of Current Research 5(7): 1897-1901.

SOCKETT D.C., CONRAD T.A., THOMAS C.D. & COLLINS M.T. 1992. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. J. Clin. Microbiol., 30, 1134–1139.

SCANU AM, BULL TJ, CANNAS S, SANDERSON JD, SECHI LA, DETTORI G, ZANETTI S, HERMON-TAYLOR J. 2007. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities. J Clin Microbiol.45:3883–90.

SOUZA G.S., RODRIGUES A.B., GIOFFRÉ A., ROMANO M.I., CARVALHO E.C., VENTURA T.L. & LASUNSKAIA E.B. 2011. Apa antigen of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as a target for species-specific immunodetection of the bacteria in infected tissues of cattle with paratuberculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 143(1/2):75-82.



SOHAL JS., SINGH SV., SINGH B., THAKUR S., ASERI GK., JAIN N., JAYARAMAN S., YADAV P., KHARE N., GUPTA S., CHAUBEY KK., DHAMA K. 2015. Control of paratuberculosis: opinions and practices. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3(3): 156-163.

ST-JEAN G, JERNIGAN AD (1991). Treatment of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ruminants. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 7(3):793–804.

STABEL J.R. 1997. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:375-380.

STEHMAN, S.M. Moléstia de Johne (paratuberculose). 1993. In: SMITH, B.P.(Ed). *Tratado de Medicina Veterinária Interna de Grandes Animais: moléstias de eqüinos, ovinos e caprinos.* São Paulo: Manole, p.823-830.

STEVENSON K., ALVAREZ J., BAKKER D., BIET F., JUAN L., DENHAM S., DIMARELI Z., DOHMANN K., GERLACH G.F., HERON I., KOPECNA M., MAY L., PAVLIK I., SHARP M., THIBAUT V.C., WILLEMSSEN P., ZADOCKS R.N. & GREIG A. 2009. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol.* 9:212-224.

STEWART DJ, VAUGHAN JA, STILES PL, NOSKE PJ, TIZARD ML, PROWSE SJ, MICHALSKI WP, BUTLER KL, JONES SL. 2004. A long-term study in Merino sheep experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet Microbiol*, 104: 165-178.

STIEF B., MOBIUS P., TURK H., HORUGEL U., ARNOLD C., POHLE D. 2012. Paratuberculosis in a miniature donkey (*Equus asinus* f. *asinus*). *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 125:38–44.

STING R., HRUBENJA M., MANDL J., SEEMANN G., SALDITT A., WAIBEL S. 2014. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces

using different procedures of pre-treatment for real-time PCR in comparison to culture. *Vet. J.* 199(1):138–42. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.08.033.

STREETER, R. N.; HOFFSIS, G. F.; BECH-NIELSEN, S. T. 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *American Journal of Veterinary Research.* 56:1322- 4.

SWEENEY, R.W., WHITLOCK, R.H. AND ROSENBERGER, A.E.1992. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J Clin Microbiol.* 30: 166–171.

TAYLOR, A. W., WILKS, C.R., McQUEEN, D.S. 1981. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk of a cow with Johne's disease. *The Veterinary Records.* 109:532-533.

THAKUR A., AAGAARD C., STOCKMARR A., ANDERSEN P., JUNGENSEN G. 2013. Cell-mediated and humoral immune responses after immunization of calves with a recombinant multiantigenic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subunit vaccine at different ages. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 551–558. 10.1128/CVI.05574-11

USDA. USDA Foreign Agricultural Service. Disponível em <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>>. Acesso em janeiro de 2014.

VAERMAN, J. P. Effector mechanisms of IgA. *Ann Biol Clin.* 42(1):61-70, 1984.

VARY PH., ANDERSEN PR., GREEN E., HERMON-TAYLOR J., MCFADDEN JJ.1990. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 28(5): 933–937.

VERDIER, J.; DEROCHE, L.; ALLEZ, M.; LOY, C.; BIET, F.; BODIER, C. C.; BAY, S.; GANNEAU, C.; MATYSIAK-BUDNIK, T.; REYRAT, J. M.; HEYMAN, M.; CERF-BENSUSSAN, N.; RUEMMELE, F. M.; MENARD, S. 2013. Specific

IgG Response against *Mycobacterium avium paratuberculosis* in Children and Adults with Crohn's Disease, PLOS ONE. 8(5): e62780. doi:10.1371/journal.pone.0062780.

VIDIC B., SAVIC S., VIDIC V., JOVICIN M., STORY N. 2013: Economic impact of paratuberculosis on milk production. Biotechnol. Anim. Husb. 29: 183-191.

WADDELL, L.A.; RAJIĆ, A.; SARGEANT, J. et al. 2008.. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*: a systematic review. *Can. J. Public. Health.* 99:145-155.

WHITLOCK H.R., BUERGELT C. 1996: Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (Including pathology). *Vet. Clin. North Am. Anim. Pract.*, 12, 345–356.

WHITTINGTON RJ, BEGG DJ, DE SILVA K, PLAIN KM, PURDIE AC. 2012. Comparative immunological and microbiological aspects of paratuberculosis as a model mycobacterial infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 15;148(1-2):29-47.

WHITTINGTON RJ. 2010. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, p 244–266 *In* Behr MA, Collins DM, editors. (ed), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. CABI, Wallingford, United Kingdom

WHITTINGTON R.J. & WINDSOR P.A. 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet. J.* 179(1):60-69.

WHITTINGTON R.J., TARAGEL C.A., OTTAWAY S., MARSH I., SEAMAN J. & FRIDRIKSDOTTIR V. 2001. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet. Microbiol.* 79:311-322.

WOLF, R., CLEMENT, F., BARKEMA, H., AND ORSEL, K. 2014. Economic evaluation of participation in a voluntary Johne's disease prevention and control

program from a farmer's perspective—The Alberta Johne's Disease Initiative. *Journal of dairy science*.97: 2822- 2834.

YAMASAKI E.M., BRITO M.F., MOTA R.A., MCINTOSH D. & TOKARNIA C.H. 2013. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(2):127-140.

YAMASAKI E.M., TOKARNIA C.H., GALVÃO A., GOMES M.J.P., CHIES J.A.B., VEIT T.D., ARAGÃO A.P. & BRITO M.F. 2010. Aspectos clínicos patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. *Pesq. Vet. Bras.* 30(11):921-932.

YOKOMIZO, Y., H. YUGI, AND R. S. MERKAL. 1985. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn. J. Vet. Sci.* 47:111–119.

# APÊNDICE I

