

**DETECÇÃO DO ANTÍGENO APA DE MICOBACTÉRIA EM LEITE
DE VACA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA PARATUBERCULOSE
EM REBANHO LEITEIRO**

EFRANCI SELIPRANDY RIBEIRO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2018**

**DETECÇÃO DO ANTÍGENO APA DE MICOBACTÉRIA EM LEITE
DE VACA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA PARATUBERCULOSE
EM REBANHO LEITEIRO**

EFRANCI SELIPRANDY RIBEIRO

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

Orientador (a): Dr^a. Elena Lassounskaia

Co-orientador (a): Giliane da Silva de Souza Cabral

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO – 2018

DETECÇÃO DO ANTÍGENO APA DE MICOBACTÉRIA EM LEITE DE VACA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA PARATUBERCULOSE EM REBANHO LEITEIRO

EFRANCI SELIPRANDY RIBEIRO

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

Aprovada em 06 de fevereiro de 2018

Comissão Examinadora:

Dr^a. Alba Lucínia Peixoto Rangel – UENF
Doutora em Biotecnologias e Biotecnologia

Dr. Milton Masahiko Kanashiro – UENF
Doutor em Biotecnologias e Biotecnologia

Dr^a. Regina Célia de Souza Campos Fernandes - FMC
Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias – UFRJ

Dr^a. Giliane da Silva de Souza Cabral – UENF
Doutora em Biotecnologias e Biotecnologia
CO-ORIENTADORA

Prof^a. Dr^a. Elena Lassounskaia – UENF
Doutora em Ciências Médicas
ORIENTADORA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do Reconhecer, do Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob co-orientação da Dr^a Giliane da Silva de Souza Cabral e orientação da Prof^a. Dr^a Elena Lassounskaia.

Apoio:

- UENF- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Dedico esta conquista aos meus amados pais, Zilma e Efraim, ao meu esposo Wigo, aos meus irmãos Sávia e Efraim e a todos os meus amigos que sempre me incentivaram, em especial a amiga **Greiciane Alves Ferraz Peres** (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa se encerra em minha vida e com ela a sensação de dever cumprido. No entanto, sozinha eu jamais conseguiria chegar até aqui. Muitas pessoas foram importantes no decorrer dessa caminhada, das quais, sempre sentirei uma enorme gratidão.

Só poderia começar agradecendo a Deus por me dar o dom da vida e por tudo que me proporcionou até aqui. Por ter me dado força e coragem necessária para vencer todos os obstáculos enfrentados nesses dois últimos anos. Agradeço também por ele ter colocado em minha vida pessoas maravilhosas "... Nunca me deixes esquecer que tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser vem de Ti Senhor..."

Agradeço em especial aos meus pais, Efraim e Zilma pelo amor incondicional e por serem o meu alicerce. Amo muito vocês! Jamais poderei retribuir tudo que fizeram e ainda fazem por mim e pelos meus irmãos.

Ao meu esposo que nunca mediu esforços para me ajudar, que é companheiro e amigo e jamais deixou que eu desistisse em momento algum. Obrigada pelo carinho, cuidado e incentivo até aqui.

Aos meus irmãos Sávia e Efraim e meus sobrinhos Lavínia e Arthur por me proporcionarem momentos maravilhosos.

À minha tia Silési pelo apoio durante o decorrer de todo o mestrado.

Aos meus tios Maria e Valber por ter aberto as portas de sua casa para me receber durante esses dois anos. Obrigada por todo carinho, cuidado e incentivo.

Ao grupo "Elenetes": Giliane, Anderson, Fabrício, Thatiana, Verônica, Andreza, Vinícius, Igor, Sanderson, Letícia, Gislane e Nina. Obrigada pelos ensinamentos e momentos de descontração que me proporcionaram. Jamais esquecerei vocês.

A minha orientadora Dr^a.Elena Lassounskaia por ter me recebido com muito carinho, por ter confiado a mim a realização desse trabalho, por todo incentivo, disponibilidade e dedicação.

A minha co-orientadora Dr^a.Giliane Souza pela disponibilidade e dedicação em orientar esse trabalho. Por todos os ensinamentos que me proporcionou e pela paciência.

A uma amiga muito querida e especial que conheci na UENF, dona Marina. Obrigada pelo incentivo e pelas conversas que muito acrescentou a minha vida. Que Deus a abençoe grandemente.

A amiga Mariana Giarola, pelas idas e vindas da UENF, pelas conversas e por ser sempre presente em minha vida. Obrigada por sua amizade.

As minhas eternas amigas Letícia, Nadábria, Gabriela, Josélia e Elisângela que em meio aos momentos mais difíceis, me proporcionaram alegrias imensas e por muitas vezes entenderam minha ausência. Amo muito vocês!

Aos amigos que a UENF me concedeu: Diego, Jucélia, Débora, Dayse, Thatiana, Poliara, Francilane, Igor e Anderson. Com vocês a caminhada se tornou menos árdua.

A professora Dr^a. Olga pela disponibilidade e aceitação em colaborar com experimentos.

Aos amigos do Laboratório Centrolab: Juliana, Fernanda, Sabrina, Margareth e Lucif por toda paciência e apoio durante essa jornada. Ao Dr. Pedro, Dr^a. Ignês e Álvaro por me apoiarem e incentivarem desde quando decidi fazer o mestrado. Obrigada por tudo!!!

Ao professor Marcos Paulo Machado Thomé que foi o grande incentivador. Obrigada por acreditar em mim e por todo incentivo.

A professora Ana Bárbara Freitas Rodrigues pela disponibilidade de revisar este trabalho. Muito obrigada mesmo.

Aos professores Dr. Milton, Dr^a Alba e Dr^a. Regina por participarem da minha banca.

Agradeço a CAPES, pela concessão da bolsa de Pós-graduação.

A UENF por ter me acolhido nesses dois anos, me proporcionando uma gama de novos conhecimentos.

À todos que contribuíram direta e indiretamente para que esta conquista fosse alcançada.

Muitíssimo obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
Resumo.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Características do patógeno.....	3
2.2 Fases da doença e aspectos clínicos.....	5
2.3 Transmissão.....	6
2.4 Patogênese.....	8
2.5 Paratuberculose na América Latina.....	10
2.6 Produção de leite e Paratuberculose.....	13
2.7 Métodos de diagnóstico laboratorial.....	16
3. JUSTIFICATIVA.....	19
4. OBJETIVOS.....	20
4.1 Objetivo geral.....	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1 Coleta do material biológico de rebanho bovino leiteiro.....	21
5.2 Sorodiagnóstico.....	21
5.3 Imunodeteção do antígeno APA no leite e fezes.....	22
5.3.1 Processamento do leite.....	22
5.3.2 Processamento das fezes.....	22
5.3.3 Imunoprecipitação e análise por imunoblot.....	23
5.3.4 Elisa Sanduiche.....	24
5.4 Teste bacteriológico	25
6 RESULTADOS.....	26

6.1 Screening dos animais através de ELISA para detecção de anticorpos anti-MAP em soro e leite das vacas leiteiras.....	26
6.2 Imunodeteção do antígeno APA em sobrenadante fecal e em leite através de Elisa sanduiche.....	32
6.3 Isolamento do antígeno APA em sobrenadante fecal e leite de animais suspeitos de PTB através de imunoprecipitação.....	34
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÃO.....	43
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detecção de anticorpos anti-MAP em soros de bovinos (sorodiagnóstico).....	28
Figura 2. Detecção de anticorpos anti-MAP em leite de bovinos (sorodiagnóstico).....	29
Figura 3. Imunodeteccção do antígeno APA-MAP em sobrenadante de fezes de bovinos com PTB, suspeitos e sadios, através de ELISA sanduiche.....	33
Figura 4. Imunodeteccção do antígeno APA-MAP em leite de bovinos com PTB, suspeitos e sadios, através de ELISA sanduiche.....	34
Figura 5. Imunodeteccção do antígeno APA-MAP em sobrenadante fecal de bovinos suspeitos e sadios, através de Western blotting.....	35
Figura 6. Imunodeteccção do antígeno APA-MAP em leite de bovinos suspeitos e sadios, através de Western blotting.....	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Coleta de amostras de soro, fezes e leite em diferentes Regiões do Norte e Noroeste Fluminense.....	26
TABELA 2. Detecção de vacas reagentes aos antígenos de MAP em teste ELISA (Kit ID SCREEN®, Paratuberculosis Indirect ELISA kit, ID Vet, França) em rebanhos bovinos leiteiros da Região Norte e Noroeste Fluminense.....	30
TABELA 3. Identificação de animais promissores através do teste de Elisa (Kit ID SCREEN®, Paratuberculosis Indirect ELISA kit, ID Vet, França) em rebanhos bovinos leiteiros da Região Norte e Noroeste Fluminense.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

- APA – Antígeno rico em prolina e alanina
- BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente
- BCG – Bacilo Calmette – Guérin
- °C – Graus Celsius
- Células M – Células micropregas
- D. O. – Densidade ótica
- DAB – Diaminobenzidina
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- ELISA – Ensaio de imunoadsorção ligado á enzima
- EUA – Estados Unidos da América
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IFN- γ – Interferon γ
- IL – Interleucina
- IP – Imunoprecipitação
- LBR – Laboratório de Biologia do Reconhecer
- LMPA – Laboratório de Morfologia e Patologia Animal
- Mab – Anticorpo monoclonal
- MAP – *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*
- Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*
- Célula NK – *Natural Killer*
- OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
- OPD – O-fenilenodiamina
- PBS – Salina fosfatada tamponada
- PBST – Salina fosfatada tamponada acrescida de Tween
- pH – Potencial Hidrogeniônico
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PTB – Paratuberculose

PPD – Teste cutâneo da tuberculina

rAPA – Antígeno rico em prolina e alanina recombinante

SDS – Dodecilsulfato de sódio

Th1 – Linfócito T auxiliar tipo I

TNF- α – Fator de necrose tumoral alpha

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense

WB – *Western blotting*

ZN – Ziehl Neelsen

Resumo

A pecuária bovina é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro. A paratuberculose (PTB), ou doença de Johne, é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Os animais doentes apresentam sinais de diarreia, perda de peso, redução da produção de leite, levando aos prejuízos econômicos. O MAP é eliminado nas fezes e leite de animais infectados, tanto durante a manifestação clínica quanto na fase subclínica da infecção, contaminando outros animais e a pastagem. Além disso, existem relatos de possível associação da infecção por MAP, que pode ser transmitida pelo leite contaminado, com a doença de Crohn em humanos. Dessa forma, essa doença é de grande relevância socioeconômica. No entanto, sua importância no Brasil ainda é subestimada devido ao diagnóstico precário e falta de métodos de diagnóstico que sejam baratos, rápidos e de alta sensibilidade e especificidade. Sendo assim, novas abordagens para o imunodiagnóstico baseadas na detecção e identificação de antígenos de bactéria em leite podem ser úteis para o diagnóstico da PTB e controle sanitário do leite. Um dos antígenos ativamente secretado por MAP e que pode ser utilizado como alvo de detecção é a proteína APA. De acordo com os nossos dados anteriores, o antígeno APA está presente nas fezes do gado com PTB e pode servir como um biomarcador da doença. O antígeno pode ser detectado nas fezes do gado com o uso de anticorpos anti-APA, monoclonais e policlonais, que já foram produzidos no nosso laboratório e utilizados para geração de um novo kit de ELISA sanduiche para detecção do antígeno APA nas fezes de bovinos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença da proteína APA em leite de animais com PTB através de métodos imunológicos, contribuindo assim como uma nova alternativa de diagnóstico para a doença. Os anticorpos produzidos, assim como nas fezes, também foram utilizados para isolamento do antígeno APA-MAP nas amostras de leite através de imunoprecipitação. Os resultados demonstraram que o antígeno APA secretado por MAP pode ser isolado do leite das vacas com PTB através de imunoprecipitação. O antígeno é secretado no leite na sua isoforma glicosilada de 70 kDa. Entretanto, o APA está presente nas amostras de leite dos animais infectados em quantidade ínfima, quando comparado ao encontrado nas fezes, o que não permite sua detecção através de ELISA sanduiche. Para tanto, concluiu-se que o imunodiagnóstico da PTB em bovinos, utilizando amostras de leite de vaca para detecção do antígeno APA-MAP, exige o isolamento prévio dessa proteína através de imunoprecipitação ou outro método, sendo que o teste ELISA sanduiche apresenta baixa sensibilidade para leite não processado.

Palavras chaves: Paratuberculose, antígeno APA, leite, imunodiagnóstico.

Abstract

The livestock breeding is one of the most important sectors of Brazilian agribusiness. Paratuberculosis (PTB), or Johne's disease, is an infectious-contagious disease caused by *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). Sick animals show signs of diarrhea, weight loss, reduced milk production, leading to economic losses. MAP is eliminated in feces and milk from infected animals, both during clinical manifestation and in the subclinical stage of infection, contaminating other animals and environment. In addition, there are reports of possible association of MAP infection, which can be transmitted by contaminated milk, with Crohn's disease in humans. Thus, this disease is of great socioeconomic relevance. However, its importance in Brazil is still underestimated due to the precarious diagnosis and the lack of diagnostic methods that are cheap, fast and of high sensitivity and specificity. Thus, new approaches to immunodiagnosis based on the detection and identification of bacterial antigens in milk may be useful for the diagnosis of PTB and milk health control. One of the antigens that is actively secreted by MAP and which can be used as a detection target is the APA protein. According to our previous data, the APA antigen is present in the faeces of cattle with PTB and may serve as a biomarker of the disease. The antigen can be detected in cattle faeces with the use of anti-APA antibodies, monoclonal and polyclonal, which were already produced in our laboratory and used to generate a new sandwich ELISA kit for the detection of APA antigen in bovine faeces. Therefore, the objective of this work was to verify the presence of the APA protein in milk of animals with PTB through immunochemical methods, thus contributing as a new diagnostic alternative for the disease. The antibodies produced, as well as in faeces, can also be used for isolation of the APA-MAP antigen in the milk samples by immunoprecipitation. The results demonstrate that MAP-secreted APA antigen can be isolated from the milk of cows with PTB through immunoprecipitation. The antigen is being secreted into the milk in its 70 kDa glycosylated isoform. However, APA is present in the milk samples of infected animals in a very small amount when compared to that found in feces, which does not allow their detection through sandwich ELISA. Therefore, it was concluded that the immunodiagnosis of PTB in cattle using cow's milk samples for the detection of the APA-MAP antigen requires the previous isolation of this protein through immunoprecipitation or another method, and the sandwich ELISA test has low sensitivity for unprocessed milk.

Keywords: Paratuberculosis, APA antigen, Milk, Immunodiagnos

1 INTRODUÇÃO

Segundo os dados fornecidos pelo IBGE em 2014, o Brasil foi considerado o segundo país com o maior rebanho do mundo, maior exportador de carne bovina, segundo maior produtor de carne e quinto maior produtor de leite, ficando atrás somente da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China (USDA, 2014).

A paratuberculose (PTB), também conhecida como doença de Johne, é uma enterite granulomatosa crônica infectocontagiosa do gado bovino e outros ruminantes, sendo causada pelo agente etiológico *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) (CUNHA & BALLUS, 2009; CAZER *et al.*, 2013; SALEM *et al.*, 2013).

O MAP foi descrito pela primeira vez no ano de 1985 na Alemanha como forma atípica do *Mycobacterium tuberculosis*, por Johne Frothingam. O bacilo foi encontrado em uma vaca com seis anos de idade que apresentava perda de peso e diarreia crônica (YAMASAKI *et al.*, 2013). Ao longo dos anos o microrganismo recebeu diferentes denominações chegando ao ano de 1990 com a denominação taxonômica de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, a qual é aceita até hoje (MANNING & COLLINS, 2001; AYELE *et al.*, 2001; SALEM *et al.*, 2013).

Esse patógeno possui uma série de características específicas em comparação com outras micobactérias, como a necessidade pela micobactina para seu crescimento em meios artificiais ou a resistência a temperaturas elevadas, podendo sobreviver a processos de pasteurização (LAMBRECHT & COLLINS, 1993; MANNING & COLLINS, 2001; BERGHAUS *et al.*, 2006; PATEL & SHAH, 2011; SALEM *et al.*, 2013).

A PTB acomete ruminantes domésticos, como caprinos, ovinos, bovinos, bubalinos, e ruminantes selvagens, podendo acometer também equinos, suínos e lebres (GRANT, 2005; CUNHA & BALLUS, 2009; MEDEIROS *et al.*, 2012). Em bovinos, apresenta-se com maior frequência no rebanho leiteiro em animais de dois a cinco anos de idade, podendo também se manifestar após o parto, sendo este um fator considerado “desencadeante” do aparecimento dos sintomas da doença (ACYPRESTE *et al.*, 2005).

O MAP é transmitido pela via fecal-oral, sendo os animais geralmente infectados no início da vida através da ingestão de água, pastagem, leite ou colostro contaminados com fezes contendo a presença do MAP (CHIODINI *et al.*,

1984). Outras vias de transmissão são a intrauterina e através do sêmen. No entanto, a principal fonte de contaminação são as fezes, onde o microrganismo é eliminado em maior quantidade, contaminando a pastagem e disseminando a doença em todo rebanho (ELTHOLTH *et al.*, 2009; BEHR & COLLINS, 2010; MEDEIROS *et al.*, 2012; MCSPADDEN *et al.*, 2013).

De acordo com as informações existentes, a PTB é uma doença de distribuição global e o rebanho leiteiro é o mais acometido, pois devido ao manejo, é mais propício a propagação do MAP entre os animais. As estimativas demonstram que 30 a 50% do rebanho mundial estão infectados com o MAP (NIELSEN & TOFT, 2008; BEHR & COLLINS, 2010).

A propagação da doença em um rebanho gera perdas econômicas significativas, dentre elas a redução da produtividade leiteira, descarte prematuro de animais e aumento dos custos sanitários. Além das perdas econômicas, a doença também tem importância em saúde pública pela possibilidade do MAP estar associado à doença de Crohn em humanos, no qual o principal veículo de transmissão seria o leite e seus derivados, sendo que o MAP é resistente à pasteurização. Entretanto, se a micobactéria é o agente causador da doença ou é uma bactéria oportunista, ainda não foi comprovado cientificamente (ABBAS *et al.*, 2011; FARIA *et al.*, 2014).

Por essas razões, tanto o diagnóstico e controle da PTB no gado leiteiro, quanto o controle microbiológico de leite nos laticínios são importantes tarefas veterinárias e de vigilância sanitária. Existe uma grande necessidade de produzir novos métodos de diagnóstico que sejam capazes de identificar a doença em estágio inicial e na fase subclínica, fase esta que contribui para a disseminação da doença, uma vez que o animal elimina MAP no ambiente antes do aparecimento dos sinais clínicos. Sendo assim a obtenção de métodos que possibilitem a identificação do MAP e de seus antígenos liberados no leite seria uma forma de contribuir com uma nova alternativa de diagnóstico da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do patógeno

O *Mycobacterium avium subesp. paratuberculosis* (MAP) é membro da família *Mycobacteriaceae*, um bacilo aeróbico, patógeno intracelular facultativo, imóvel, ou seja, que não possui flagelo, não esporulado, não encapsulado, gram positivo, no entanto não parece se adequar bem ao grupo das bactérias gram-positivas porque geralmente não mantém bem a coloração de cristal violeta (AYELE *et al.*, 2001; SALEM *et al.*, 2013; MAROUDAM *et al.*, 2015).

Apresentam crescimento lento e a temperatura ideal para seu crescimento varia entre 25 °C a mais de 50 °C. Possui morfologia de um bastonete, com dimensão aproximada de 0,2-0,6 µm de largura e 1,0-10 µm de comprimento. Sua parede celular é rica em ácidos micólicos, cerca de 60%, o que lhe proporciona propriedades de um BAAR (bacilo álcool ácido resistente) e, também cria hidrofobicidade e maior resistência a baixo pH, temperatura elevada e a uma variedade de produtos químicos (cloração da água) e físicos (pasteurização) (MANNING & COLLINS, 2001; AYELE *et al.*, 2001; GRANT, 2005; CUNHA & BALLUS, 2009; PATEL & SHAH, 2011; SALEM *et al.*, 2013; MAROUDAM *et al.*, 2015).

Uma característica marcante do MAP é que pode distingui-lo das demais micobactérias é a sua incapacidade de produzir micobactina. Seu crescimento é dependente dessa substância, a qual é um aditivo nutricional à base de complexos solúveis de ferro, o que permite o crescimento do microrganismo fora do hospedeiro, podendo então crescer em meios de culturas artificiais como *Herrold Egg Yolk Medium* (HEYM), *Reid-Watson* ou *Lowenstein Jensen* (LJ) (BARCLAY *et al.*, 1985; LAMBRECHT & COLLINS, 1993).

Devido o seu isolamento e cultivo em meios de cultura ser uma tarefa trabalhosa e demorada, é considerado um microrganismo fastidioso. Quando esse microrganismo cresce em meios artificiais como os supracitados, formam colônias rugosas despigmentadas, de crescimento lento em torno de 8 a 16 semanas (CHIODINI *et al.*, 1984; BARCLAY *et al.*, 1985; GOMES *et al.*, 2002).

Embora o MAP não cresça fora do hospedeiro, pois necessita de micobactina para seu crescimento, ele tem a capacidade de sobreviver no meio

ambiente por cerca de um ano sob condições favoráveis como o solo úmido (BERGHAUS *et al.*, 2006).

As bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium* secretam várias proteínas que são detectáveis em filtrado de meio de cultura. Dentre essa variedade de proteínas, destaca-se a proteína APA (antígeno alanina-prolina), a qual possui uma alta porcentagem de alanina (20%) e prolina (20%), e além disso, é uma das proteínas mais secretadas pelas micobactérias durante seu crescimento (GIOFFRÉ *et al.*, 2009).

A proteína APA é encontrada em algumas micobactérias como *M. bovis* (MB), *M. tuberculosis* (MT) e *M. avium subsp. paratuberculosis* (MAP), no entanto, se expressa de forma diferenciada nas bactérias da família *M. tuberculosis* e *M. avium*. A organização dos aminoácidos da proteína APA do MAP diferencia-se em comprimento com outros ortólogos. No MAP a proteína APA possui 368 resíduos, 43 aminoácidos a mais que no complexo de *M. tuberculosis* (GIOFFRÉ *et al.*, 2009).

Em estudo realizado por Giofré *et al* (2009), foi demonstrado que no sobrenadante de filtrado de cultura o peso molecular da proteína APA secretada pelo MAP é representado por 50/60 kDa, enquanto que *M. bovis* é representado por um peso molecular de 45/47 kDa. Estudos posteriores, realizados por Souza *et al.*, 2011, demonstraram que os anticorpos monoclonais produzidos em nosso laboratório podem de forma específica reconhecer antígenos APA de diferentes espécies micobacterianas e, foi selecionado um anticorpo específico (Mab) para APA-MAP, que não reconheceu o APA-Mtb ou APA-MB.

Esse anticorpo monoclonal foi útil para a imunodeteção específica de MAP em testes imuno-histopatológicos, utilizando tecidos intestinais de vacas com PTB. Em estudo posterior realizado por Souza, (2015), foi revelado pela primeira vez a presença deste antígeno nas fezes dos animais com PTB, demonstrando que a proteína APA é um novo biomarcador da PTB, uma vez que, não foi detectado nas fezes dos animais saudáveis, detectada apenas na sua forma glicosilada, com peso molecular entre 60 e 70 kDa em animais com PTB.

2.2 FASES DA DOENÇA E ASPECTOS CLÍNICOS

Segundo um estudo realizado por Whitlock e Buergelt (1996), a progressão da doença de Johne pode ser dividida em quatro fases diferentes de acordo com a severidade dos sinais clínicos, sendo caracterizadas da seguinte forma:

- Fase I: Infecção silenciosa – geralmente é detectada em animais jovens com menos de dois anos de idade, essa é a fase em que o animal não apresenta sinais clínicos da infecção. O animal pode liberar quantidades mínimas do microrganismo, no entanto, não é possível ser detectado por meio de testes de diagnóstico. A detecção da doença nessa fase, só seria possível através de uma autópsia para cultura do tecido.

- Fase II: Doença subclínica – essa é a fase em que os animais portadores do MAP são frequentemente adultos e não mostram sinais clínicos da doença. Entretanto, cerca de 15 a 25% desses animais podem apresentar testes positivos para a presença de MAP em fezes ou presença de anticorpos anti-MAP no soro. Nesta fase, animais com resultado negativo na cultura fecal pode liberar um número reduzido de bactérias nas fezes (não sendo identificado na cultura), resultando na contaminação do ambiente onde estes vivem e colocando em risco os demais animais do rebanho. O animal pode permanecer neste estágio sem desenvolver a doença clínica ou pode progredir para estágio clínico, tipicamente após pelo menos 2 anos de infecção.

- Fase III: Doença clínica – nessa fase os animais começam a apresentar sinais clínicos da doença, tais como: diarreia persistente ou intermitente, perda de peso, queda na produção de leite, lesões histopatológicas no íleo ou em outras partes do trato gastrointestinal. A maioria dos animais estarão positivos na cultura das fezes e em testes para detecção de anticorpos anti-MAP.

- Fase IV: Estágio final - é o estágio avançado da doença. É caracterizado pela progressão da fase três para a fase quatro, resultando em maior grau de emagrecimento do animal, hipoproteïnemia, continuação das lesões no trato gastrointestinal e em alguns casos podem se espalhar para outras partes do corpo como: nódulos linfáticos ou fígado seguido de morte (YAMASAKI *et al.*, 2010; MACSPADDEN *et al.*, 2012; KHOL & BAUMGARTNER, 2012; GILARDONI *et al.*, 2012; MAROUDAM *et al.*, 2015).

Apesar da infecção ocorrer principalmente na fase precoce, os sinais clínicos aparecem após 2 a 5 anos de idade. Em consequência ao período de incubação do MAP ser longo, podendo ser de cerca de 6 a 18 semanas, os animais infectados podem já estar excretando o microrganismo antes do aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença (MOTA *et al.*, 2007; LOMBARD, 2011).

Os animais afetados pela doença lançam cerca de 5×10^{12} células de MAP por dia nas fezes e estas podem permanecer viáveis durante meses no meio ambiente. Essas micobactérias também têm sido isoladas do colostro de vacas subcl clinicamente infectadas. Em consequência disto, os produtos *in natura* oriundos de vacas leiteiras, podem conter esse microrganismo (MAP) (CHIODINI *et al.*, 1984; PATEL & SHAH, 2011).

Segundo estudos realizados por Mitchell *et al.*, (2015a, b), foi relatado que apenas uma pequena proporção de animais infectados tornam-se clinicamente afetados ou com alta eliminação de micobactérias (MAP) durante o seu tempo no rebanho. De acordo com a opinião atual sobre a biologia do MAP, os relatos são de que algumas infecções são neutralizadas pelo próprio sistema imunológico do hospedeiro e outras progridem para doenças clínicas. Dessa forma, os efeitos da infecção pelo MAP no leite e sobre a produção do mesmo pode diferir entre animais que progridem para doenças clínicas e animais com infecções controladas (SMITH *et al.*, 2016).

Vale ressaltar, que alguns animais infectados podem não apresentar sinais clínicos durante a sua vida produtiva, o que torna uma das maiores dificuldades em controlar a infecção por MAP, pois os animais frequentemente eliminam a bactéria nas fezes antes de mostrar quaisquer sinais clínicos, assim, insidiosamente contribuem para a disseminação da infecção (YAMASAKI *et al.*, 2010; LOMBARD, 2011).

2.3 TRANSMISSÃO

A doença de Johne é uma doença incurável e transmissível a outros animais. Sua introdução em uma população ocorre principalmente quando um animal infectado contamina a pastagem com fezes, liberando nessas, bactérias

viáveis. Além de ser encontrado nas fezes, o MAP também pode ser encontrado e transmitido pela ingestão de colostro, leite, água, pastagem e outros alimentos e assim ser facilmente disseminado, contaminando todo rebanho. A transmissão intrauterina também pode ocorrer nos casos clinicamente infectados (ELTHOLTH *et al.*, 2009).

As vacas portadoras da PTB podem excretar a bactéria diretamente no leite ou colostro ou estes podem ser contaminados com MAP por qualquer derramamento do microrganismo ou contaminação fecal durante ou após a ordenha, entretanto, a forma mais comum de transmissão é a fecal-oral (ELTHOLTH *et al.*, 2009; MEDEIROS *et al.*, 2012; MCSPADDEN *et al.*, 2013; SALEM *et al.*, 2013).

Os animais infectados que apresentam quadros de diarreia eliminam uma maior quantidade de microrganismo quando comparados com aqueles assintomáticos, no entanto, a diarreia não ocorre somente na fase clínica, mas pode ocorrer em qualquer fase da doença. No entanto, um dos problemas é que a bactéria raramente é detectada antes dos dois anos de idade, podendo o animal estar disseminando a bactéria por todo rebanho (KURADE *et al.*, 2004; CLARKE *et al.*, 2010; BEHR & COLLINS, 2010; TIMMS *et al.*, 2011).

A frequência da PTB é muito maior em rebanhos criados em confinamento, pois uma vez que a principal fonte de contaminação é a fecal-oral, a pastagem fica contaminada através das fezes e em consequência, todo rebanho fica comprometido (AYELE *et al.*, 2001). Mesmo que a eliminação do MAP nas fezes dos animais durante a fase subclínica seja mínimo, com o passar do tempo gera uma fonte de contaminação significativa do ambiente e uma insidiosa propagação da infecção em todo o rebanho (CHIODINI *et al.*, 1984).

Os fatores como o confinamento, condições precárias de higienização e a qualidade dos solos como solos ácido e úmido, contribui de forma significativa para a disseminação da doença (GILARDONI *et al.*, 2012).

De acordo com Paolicchi & Romano (2007), as chances de infecção são minimizadas à medida que a idade avança, sendo os animais adultos menos suscetíveis. No entanto, não estão isentos do contágio, podendo adquirir a infecção dependendo da carga bacteriana a qual estão expostos.

Embora a maioria dos relatos sejam da PTB em gado leiteiro, é de grande importância ressaltar que a doença afeta também outras espécies de mamíferos, tais como: ovinos, caprinos, veados, camelídeos, ruminantes selvagens e exóticos (WHITTINGTON *et al.*, 2012; BENNETT *et al.*, 2012; ROSSEELS & HUYGEN, 2008; KHAN *et al.*, 2010).

A doença também tem sido registrada em uma variedade de espécies não ruminantes, nos quais estão incluídos: coelhos, cavalos, burros, cães, gatos e porcos (STEVENSON *et al.*, 2009; BEARD *et al.*, 2001; GLANEMANN *et al.*, 2008; STIEF *et al.*, 2012; GREIG *et al.*, 1999).

Embora os relatos naturais da enfermidade sejam pontuais, é considerada a possibilidade de transmissão interespecífica e disseminação do agente por meio de compra e venda de animais infectados, o que pode contribuir para a dispersão da doença em outras cidades, Estados e até mesmo países (LOMBARD, 2011).

2.4 PATOGÊNESE

A infecção pelo MAP inicia-se pela ingestão de material contaminado por via oral (via fecal-oral). Após a ingestão, esse microrganismo chega ao lúmen intestinal e nele as micobactérias são absorvidas pelas células M (*microfolds cells*), as quais são especializadas em absorção de partículas que se ligam principalmente a bactérias e as transportam para a camada da submucosa. Após atravessar a camada epitelial, o MAP é fagocitado por macrófagos presentes na submucosa (CHIODINI *et al.*, 1984; PARK *et al.*, 2016).

Através dos macrófagos, as micobactérias podem ser transportadas para outros órgãos, como útero e assim atingir o feto, para as glândulas mamárias e testículos. (MAROUNDAM *et al.*, 2015).

Como ocorre com outras micobactérias, o MAP também é capaz de sobreviver e replicar em macrófagos não ativados, inibindo a maturação de fagolisossoma. O MAP eventualmente causa a morte celular de células infectadas, após o MAP ser liberado, ele pode ser fagocitado por macrófagos recentemente acumulados e células dendríticas (PARK *et al.*, 2016).

Nos macrófagos o MAP inicia o seu ciclo de reprodução e as células dendríticas infectadas migram para os linfonodos intestinais induzindo 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 à contenção de micobactérias. Logo, o sistema imune é capaz de controlar a infecção, inibindo a multiplicação da bactéria, o que corresponde a uma longa fase subclínica, chegando de dois a cinco anos, sem eliminação do microrganismo nas fezes ou com eliminação intermitente (CHIODINI *et al.*, 1984; LILEMBAUN *et al.*, 2007).

Os macrófagos e células dendríticas, são ativadas por citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon γ (IFN- γ). O IFN- γ desempenha um papel importante na ativação de macrófagos e células T e, é produzido por células infectadas e células natural *killer* (NK). Os macrófagos ativados e as células dendríticas produzem interleucina 12 (IL-12) e apresentam antígenos para células T CD4⁺ naive através de moléculas de MHC de classe II. A IL-12 desencadeia a diferenciação de células T CD4⁺ naive em células T helper 1 (Th1) (PARK *et al.*, 2016).

As células Th1 produzem citocinas tais como IL-2 e IFN- γ , que desempenham papéis na promoção da expansão de células Th1 antígeno específica e na maturação de macrófagos. Essas respostas específicas a determinados antígenos, promovem a evolução da imunidade inata para imunidade adaptativa mediada por células (PARK *et al.*, 2016).

Nos estágios posteriores da infecção, o aumento dos anticorpos é frequentemente observado com o aumento da liberação bacteriana (MAROUNDAM *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2016).

A inflamação induzida na mucosa intestinal por MAP provoca o espessamento da parede intestinal do animal, o que leva à redução da capacidade de absorção do intestino e enteropatia com perda de proteínas (MAROUNDAM *et al.*, 2015).

Nos ruminantes, o local acometido pela doença é a junção ileocecal e a região do jejuno. O período subclínico é inversamente relacionado com a dose de infecção, ou seja, quanto mais MAP ingerido mais curto será o período de tempo para exibir sinais clínicos (LOMBARD, 2011).

2.5 PARATUBERCULOSE NA AMÉRICA LATINA

A América Latina é uma região do continente Americano, onde estão localizados os países, cujas línguas nativas são o espanhol e o português. Os países Argentina, Brasil, Chile, Bolívia, Colômbia, Equador Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela são pertencentes à América do Sul, enquanto a Costa Rica, Cuba, El Salvador, Honduras, Nicarágua, Panamá, Guatemala e República Dominicana pertencem à América Central e o México à América do Norte (ESPESCHIT *et al.*, 2017).

Na América Latina, cerca de 33 milhões de pessoas trabalham na agricultura e somente oito milhões vivem em áreas urbanas, o que significa que juntos representam 25% da população ativa economicamente (DAVID *et al.*, 2000). Os países latino-americanos, onde a agricultura desempenha um importante papel na economia, deve dar atenção para a pesquisa e programas governamentais focados nesta doença, uma vez que esta não afeta apenas a economia, mas também a saúde pública (ESPESCHIT *et al.*; 2017).

De acordo com a Organização Mundial de saúde animal, a PTB é uma doença de distribuição global, sendo endêmica em algumas regiões. De acordo com os dados epidemiológicos existentes, a PTB tem sido relatada em vários países, afetando ruminantes como: bovinos, caprinos, bubalinos, ovinos, ruminantes silvestres e outras espécies de mamíferos, no entanto, atinge em maior proporção os bovinos (OIE, 2014; BEHR & COLLINS, 2010).

O Brasil é o maior país da América do Sul, seu litoral é banhado pelo Oceano Atlântico e seu grande território limita dez países, exceto o Chile e o Equador, todos os demais países da América do Sul compartilham fronteiras com o Brasil, o qual é o quinto maior país do mundo. Um fator importante como o seu clima tropical favorece a criação de gado e logo, maior produtividade (SPESCHIT *et al.*, 2017).

De acordo com dados internacionais fornecidos pelo Departamento da Agricultura dos Estados Unidos, em 2013, o Brasil possuía a segunda maior densidade de gado bovino no mundo, o qual é um dos destaques do agronegócio brasileiro. Além da produção de carne, o Brasil se destaca como quinto maior produtor de leite (ESPESCHIT *et al.*; 2017).

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. 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.

Em amostras de leite, a presença do MAP foi detectada pela primeira vez em vacas infectadas clinicamente em 1929 por Alexejeff-Goloff (Alexejeff-Goloff, 1929).

Em relação aos dados existentes sobre a prevalência mundial da paratuberculose, estes variam de forma notável, pois é preciso levar em consideração a metodologia utilizada no estudo (sorologia, isolamento bacteriano, técnicas de biologia celular) e o tipo de amostra analisada (sangue, fezes, leite, tecido) (NIELSEN & TOFT, 2008; BEHR & COLLINS, 2010; YAMASAKI *et al.*, 2013).

Nos países da América Latina, a PTB já foi detectada em vários países, tanto em animais de corte, quanto de leite, em amostras de soro, fezes, leite e em produtos derivados do leite como o queijo. Em alguns países como a Argentina, Brasil e Venezuela, a presença do MAP já foi detectada até mesmo em leite pasteurizado. Embora existam dados da presença da PTB em muitos países da América Latina, em alguns como Cuba, Guatemala, República Dominicana, Nicarágua, Honduras, El Salvador, Costa Rica, Paraguai e Equador ainda não foram encontrados relatos (ESPESCHIT *et al.*, 2017).

Na maioria dos países a doença foi detectada antes do ano de 2000, no entanto, o México foi um dos países que obteve o primeiro relato da PTB em

2008, a Venezuela em 2009 e Panamá em 2013. Embora seja uma doença descrita há quase 100 anos atrás, alguns países demoraram iniciar suas pesquisas a respeito da doença (ESPESCHIT *et al.*, 2017).

No Peru, no ano de 2008, o país foi considerado livre de PTB, no entanto, esse status foi revogado quando o OIE relatou a detecção do agente no país, sem declarar qual método de diagnóstico foi utilizado (ORTIZ *et al.*, 2009). Na Bolívia os resultados para PTB são negativos, entretanto há uma maior necessidade de estudos devido à presença da doença em países que dividem fronteiras (ESPESCHIT *et al.*, 2017).

Estudos relatam que em alguns países as estimativas são de que 30 a 50% do rebanho mundial estão infectados com o MAP. No rebanho bovino com animais infectado, cerca de 10% dos animais desenvolvem a doença, os demais eliminam esse microrganismo por meio das fezes sem nenhuma manifestação dos sinais clínicos ao longo da vida (NIELSEN & TOFT, 2008; BEHR & COLLINS, 2010).

Essa manifestação clínica pode estar ligada a alguns fatores como a suscetibilidade de cada indivíduo à infecção, a ingestão de doses diferenciadas do agente etiológico da doença e a idade em que houve o primeiro contato do animal com o microrganismo (NIELSEN & TOFT, 2008). Em relação à mortalidade causada pelo MAP em um rebanho, estima-se uma porcentagem menor que 1% ao ano, podendo neste haver cerca de 70% dos animais infectados (YAMASAKI *et al.*, 2013; SALEM *et al.*, 2013).

No Brasil, há relatos de bovinos afetados pela PTB nas cinco regiões, no entanto, as informações epidemiológicas não estão apresentadas de forma detalhada, o que impede conhecer a real situação da doença no país (YAMASAKI *et al.*, 2013; SOUZA, 2015).

Dessa forma, vale destacar que é de grande valia as informações detalhadas sobre os dados epidemiológicos da doença no Brasil. Todavia, a análise e conclusão dos dados sobre a incidência da doença no país têm de ser tomadas com precaução, pois é preciso levar em consideração a variabilidade que há na especificidade e sensibilidade dos diferentes métodos, bem como as dificuldades das técnicas de diagnóstico da PTB (YAMASAKI *et al.*, 2013).

2.6 PRODUÇÃO DE LEITE E PARATUBERCULOSE

O Brasil é considerado o segundo país com o maior rebanho do mundo, maior exportador de carne bovina, segundo maior produtor de carne e quinto maior produtor de leite (USDA, 2014). No país, o agronegócio familiar conta com cerca de 5,6 milhões de propriedades de pequeno e médio porte, contribuindo assim para a produção alimentícia.

O agronegócio familiar é muito comum no Estado do Rio de Janeiro, sendo realizada na grande maioria por pequenos produtores que abastecem a si próprio e o comércio local. No entanto, não se sabe como é realizado o manejo desses animais, no que diz respeito à higienização e doenças. Dessa forma, é preciso ter todo cuidado necessário para levar ao mercado produtos de qualidade e que não ofereçam riscos a saúde humana (PNCEBT, 2006).

Ao nível da exploração agrícola, as fontes de contaminação do leite *in natura* com MAP incluem a liberação direta do patógeno de vacas clinicamente ou subcl clinicamente infectadas, contaminação fecal e mistura de leite contaminado em tanques de leite (GRANT, 2005; ELTHOLTH *et al.*, 2009).

O MAP tem sido encontrado em vários países em leite *in natura*, pasteurizado ou em pó, e em derivados de leite, incluindo os queijos vendidos em comércio a retalho. A presença de DNA desse patógeno foi encontrada em 6,5% de amostras de leite integral pasteurizado e também foram identificadas e isoladas micobactérias viáveis de algumas destas amostras (SHANKAR *et al.*, 2010; ELLINGTON *et al.*, 2005; GRANT *et al.*, 2002, AYELE *et al.*, 2005; OKURA *et al.*, 2012; YAMASAKI *et al.*, 2013).

Em estudo realizado por Faria *et al.*, (2014), foi demonstrado a presença de DNA de MAP em 10% das amostras de queijo de coalho de varejo na cidade de Parnaíba-PI, apresentando assim micobactérias viáveis, capazes de crescer em meio HEYM.

Em 2012, na Argentina, o relatório sobre o primeiro isolamento e detecção do MAP em leite comercial pasteurizado foi publicado, o que indicou o risco potencial de seu consumo pela população (PAOLICCHI *et al.*, 2012).

A PTB também está documentada em outros países da América Latina, tanto em bovinos quanto em pequenos ruminantes como ovelhas e cabras.

Estudos avaliando tanques de leite demonstraram a presença do MAP nas amostras coletadas no Chile, México e Venezuela (ESPESCHIT *et al.*, 2017).

A presença do MAP no leite e seus derivados é preocupante, pois, fica evidente que os seres humanos estão expostos a esse microrganismo através do consumo de leite *in natura* ou pasteurizado e, possivelmente, por outros produtos lácteos, como queijo e ricota. Foi sugerida uma possível relação do MAP e a doença de Crohn (MANNING & COLLINS, 2001; GRANT, 2005; ELLINGSON *et al.*, 2005; ELTHOLTH *et al.*, 2009; YAMASAKI *et al.*, 2010; KLANICOVA *et al.*, 2012, YAMASAKI *et al.*, 2013; SALEM *et al.*, 2013; FARIA *et al.*, 2014; OKURA *et al.*, 2012).

A doença de Crohn é uma doença que causa uma inflamação intestinal crônica que acomete os seres humanos suscetíveis (COLLINS *et al.*, 2000; NASER *et al.*, 2004). Assim como ocorre em animais com PTB, pacientes com a doença de Crohn apresentam inflamação granulomatosa e lesões teciduais da parede intestinal que levam a diarreia e perda de peso. No entanto, a relação da PTB com esta doença ainda é polêmica, sendo necessário a elaboração de estudos mais amplos, para identificar se o MAP é o agente causador ou se é apenas um invasor secundário do intestino dos indivíduos já comprometidos (COCITO *et al.*, 1994).

Devido às dificuldades de identificar com precisão aqueles animais portadores da doença que estão na fase subclínica e estimar o impacto da infecção sobre a produtividade dos animais, tem sido desafiador para as indústrias de laticínios, calcular suas perdas (HASONOVA & PAVLIK, 2006).

De acordo com Abbas *et al.*, (2011), há estimativas de que nos EUA a prevalência da infecção por MAP em rebanhos leiteiros varia de 20 a 40% e que a PTB possui grande importância econômica, pois para a indústria leiteira, a perda anual relatada no EUA é de 200 a 250 milhões de dólares por ano. Essas perdas são consequências da diminuição da produção, descarte prematuro dos animais, maior suscetibilidade a outras doenças, redução na fertilidade, aumento nos custos sanitários, despesas com veterinários, testes de diagnóstico e medicamentos.

Na Argentina, o impacto econômico causado pela PTB é de cerca de 6,3 milhões de dólares para o rebanho leiteiro e 22 milhões de dólares para produção de gado bovino da província de Buenos Aires (PAOLICCHI & ROMANO, 2007).

Diante do impacto causado pela PTB em alguns países como Argentina e EUA, no Brasil, o impacto econômico da PTB pode ser ainda mais elevado do que o esperado, pois é considerado o segundo país que possui o maior rebanho do mundo e com histórico de PTB em rebanhos de quase todo território nacional. No entanto, há escassez de informações a respeito da PTB e o impacto econômico causado por ela (GOMES *et al.*, 2002).

Esta situação pode levar a uma desvantagem comercial, uma vez que as perdas na produção e padrões sanitários precários de animais brasileiros podem comprometer a exportação de produtos de origem animal. Desta forma, a obtenção de dados sobre a prevalência de animais infectados exige testes laboratoriais com sensibilidade e especificidade confiáveis (ESPESCHIT *et al.*, 2017).

Logo, ocupando uma importante posição no mercado mundial agrícola, o Brasil tem a necessidade de implementar programas de controle e prevenção para garantir animais saudáveis para produção e comercialização de produtos considerados seguros para o público, uma vez que a doença pode afetar a saúde do animal, a produção de leite e carne e, conseqüentemente a saúde humana (COLLINS *et al.*, 2000; YAMASAKI *et al.*, 2013; ESPESCHIT *et al.*, 2017).

Desta maneira, para evitar grandes perdas, torna-se viável o planejamento de medidas sanitárias com objetivos diferenciados, conforme a necessidade que cada região geográfica apresenta em relação à incidência da enfermidade estudada, ou seja, medidas voltadas para a erradicação da PTB em áreas com baixa prevalência de animais infectados, ou para o controle em áreas com alta prevalência ou ainda, para o aumento da vigilância em locais em que a doença encontra-se ausente (ESPESCHIT *et al.*, 2017).

Dentre as medidas para a redução ou erradicação da PTB, existem três abordagens principais, as quais são: o gerenciamento eficiente dos animais para diminuir a transmissão, o teste e o abate e a vacinação (PARK *et al.*, 2016).

2.7 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Para o diagnóstico laboratorial da PTB existem duas abordagens básicas, os quais incluem os testes direto e indireto. Os testes direto baseiam-se na detecção do agente (MAP) ou seus componentes (DNA, proteínas, etc), e os testes indireto são utilizados para detecção de resposta imunológica contra a bactéria, incluindo anticorpos, reação celular, lesões teciduais típicas (MANNING & COLLINS, 2001; MCSPADDEN *et al.*, 2013).

No entanto, existem certos problemas que influenciam o diagnóstico dessa doença como o estágio crônico da infecção, aparecimento tardio dos sinais clínicos e de resposta imune humoral, lento crescimento bacteriano, uma vez que o sistema imunológico tem a capacidade de controlar o processo infeccioso durante um longo período de tempo. Esses fatores tornam difícil a identificação precoce do MAP o que contribui para maior disseminação da doença e dificuldades no controle e erradicação da PTB (COLLINS *et al.*, 2006, NIELSEN, 2009).

Os métodos de diagnóstico laboratoriais da PTB incluem os testes microbiológicos (cultura fecal e baciloscopia de tecidos e fezes), moleculares (PCR para detecção de DNA de MAP em tecido, leite ou fezes), sorológicos (teste Elisa de soro e leite, Fixação do complemento e AGID-imunodifusão) e testes de detecção da resposta imune celular como o teste PPD e teste de produção de IFN- γ em cultura de células mononucleares (MANNING & COLLINS, 2001; GILARDONI *et al.*, 2012; MCSPADDEN *et al.*, 2013).

No entanto, estes métodos possuem baixa sensibilidade em animais jovens ou que estão na fase inicial de desenvolvimento da doença, levando assim a resultados falso-negativos (MANNING & COLLINS, 2001).

De acordo com o avanço da doença, a sensibilidade dos testes laboratoriais aumentam, até mesmo antes do surgimento dos sinais clínicos serem visíveis (GILARDONI *et al.*, 2012). Dentre os métodos mais utilizados para o diagnóstico da PTB estão:

- Cultura fecal: embora seja considerado o padrão ouro, tem a desvantagem de possuir baixa sensibilidade, devido ao caráter intermitente de eliminação de micobactéria nas fezes, de ser demorado devido ao crescimento do

MAP ser lento (6-18 semanas em meios sólidos), e além disso, possui um custo elevado. Este método é mais sensível durante o estágio clínico da doença.

- Bacterioscopia: é utilizada a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), a qual permite a identificação do bacilo. Este método tem a vantagem de ser simples, rápido e barato, no entanto, é desvantajoso pela baixa sensibilidade e especificidade, pois não diferencia o MAP de outras micobactérias, além de levar a resultados falsos negativos quando os animais estão eliminando as micobactérias em quantidades reduzidas nas fezes.

- Reação em cadeia polimerase (PCR): este teste possibilita a detecção e identificação do DNA bacteriano nas fezes, tecido e leite, porém há dificuldades no isolamento do DNA de qualidade nas fezes. Há necessidade de equipamentos específicos, técnica e mão de obra especializada o que torna o custo elevado para países em desenvolvimento. Um outro fator é o custo com o pré tratamento das amostras de fezes com o uso de membrana sílica em minicolumnas ou partículas magnéticas, o que contribui para aumentar a taxa de detecção de MAP por esta técnica.

- ELISA: é um teste que permite estudar grande quantidade de animais em um período curto de tempo, fácil de executar, rápido, barato e mais acurado para o diagnóstico da doença na fase clínica, importante para programas de controle devido à sua praticidade. Entretanto, há baixa sensibilidade, a qual varia de acordo com as fases da infecção, e a especificidade que depende dos antígenos usados para captura dos anticorpos e pode ocorrer reação cruzada com outras micobactérias.

- PPD: este teste é útil para verificar a resposta imune celular contra o agente etiológico da PTB que se baseia em uma reação de hipersensibilidade. É muito vantajoso por ser um teste de fácil execução, porém torna-se desvantajoso por ter baixa sensibilidade e especificidade e reação cruzada com outras micobactérias presentes no ambiente, que pode levar aos resultados falso positivos.

Visto isso, é possível perceber que mesmo com todos esses métodos de diagnóstico, ainda há dificuldades em relação à sensibilidade, especificidade e custo elevado, principalmente para países em desenvolvimento (DRIEMEIER *et al.*, 1999; CHIODINI *et al.*, 1984). Há uma grande necessidade da elaboração de

métodos que tenham custo acessível, rápido, sensível e que seja realizado com o animal ainda vivo, sendo essencial também, que seja capaz de detectar a doença ainda na fase subclínica.

3 JUSTIFICATIVA

A PTB está entre as doenças transmissíveis do gado de grande relevância socioeconômica, a qual gera muitas perdas econômicas e também é considerada importante para saúde pública (OIE, 2010).

Em consequência do MAP ser encontrado em leite de vacas infectadas, é de suma importância para o comércio um produto de qualidade e sem contaminação. E os testes de controle microbiológico de leite e seus derivados são importantes para vigilância sanitária.

Atualmente existe uma grande dificuldade no diagnóstico em relação à detecção precoce do agente causal da PTB em animais. 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 e leite, transmitindo a doença, torna-se um sério obstáculo para a erradicação da doença.

Novas abordagens para imunodiagnóstico baseadas na detecção e identificação de antígenos de MAP em leite, utilizando anticorpos monoclonais podem ser úteis para o diagnóstico. Um dos antígenos ativamente secretado por MAP que pode ser utilizado como alvo de detecção é a proteína APA (SOUZA *et al.*, 2011). Estudo realizado por Souza (2015), (patente submetida em 2015) possibilitou a produção de um novo método de imunodiagnóstico da PTB, baseado em um kit de ELISA sanduiche anti-APA para imunodiagnóstico da PTB em fezes de animais para melhorar o diagnóstico dessa enfermidade. Esses dados nos motivaram a detectar a proteína APA no leite de vacas para imunodiagnóstico da paratuberculose em rebanho leiteiro.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a presença da proteína APA, secretada por MAP, em leite de vaca, utilizando métodos imunoquímicos para diagnóstico da paratuberculose em rebanho leiteiro.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Coletar material biológico (leite, fezes e soro) de gado com PTB (doença clínica ou suspeitos) em rebanhos leiteiros para testes de imunodiagnóstico;
- ✓ Estabelecer protocolos para processamento das amostras de leite indicados para o isolamento do antígeno APA –MAP através de métodos imunoquímicos;
- ✓ Estabelecer protocolos para a detecção da proteína APA em leite de bovinos com PTB através de métodos imunoquímicos (ELISA, imunoprecipitação, *Western Blotting*), utilizando anticorpos anti-APA policlonal IgY de galinha e monoclonal IgG murino já produzidos como ferramenta;
- ✓ Identificar animais com PTB nos rebanhos através dos métodos de diagnóstico da PTB convencionais (teste de detecção dos anticorpos anti-MAP em soro e leite bovino utilizando kit ELISA comercial ID-Vet, França) e teste bacteriológico de cultura de fezes (CATTLETYPE® MAP HEYM);
- ✓ Aplicar novo teste imunoquímico para a detecção de antígeno APA em leite e fezes e comparar sensibilidade do novo teste e métodos de diagnóstico.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO DE REBANHO BOVINO LEITEIRO

Foram coletadas amostras de sangue, leite e fezes de 96 animais aparentemente saudáveis e suspeitos de PTB em diferentes fazendas da região Norte e Noroeste Fluminense. 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. Para a coleta do leite, aproximadamente 50 mL foram coletados dos tetos dos animais e armazenados em tubos de polipropileno, previamente esterilizados. As amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos com tampa, identificadas, refrigeradas e transportadas ao LBR, UENF.

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. As amostras de leite e de fezes coletadas foram armazenadas a -70 °C.

5.2 SORODIAGNÓSTICO

A detecção de anticorpos anti-MAP foi realizada no soro e leite através do ensaio de ELISA Indireto, por meio do kit comercial PARAS-4P ID-Vet *Screen® Paratuberculosis Indirect Screening test* (França) segundo as instruções do fabricante, com uso de placas de microtitulação de 96 poços, previamente sensibilizadas com os antígenos MAP.

A leitura das placas foi realizada por meio de um espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm (D.O 450nm). A razão amostra/controle positivo (S/P) foi utilizada para a interpretação dos resultados. $S/P = (\text{valor da D.O 450nm da amostra} - \text{valor da D.O 450nm do controle negativo}) / (\text{valor da D.O 450nm do controle positivo} - \text{valor da D.O 450nm do controle negativo}) \times 100$.

De acordo com as recomendações do fabricante, as amostras de soro foram consideradas negativas para anticorpos anti-MAP quando os valores de S/P foram iguais ou menores que 60%; foram consideradas suspeitas quando o ponto de corte ficou entre 60% e 70% e valores de S/P iguais ou maiores que 70% foram considerados positivos. Para o leite, o ponto de corte das amostras difere

das de soro, segundo as instruções do fabricante. As amostras de leite são consideradas negativas quando S/P for menor ou igual a 15%; são consideradas positivas quando S/P for maior do que 15%. Quando testados as amostras de leite individual que estiveram pobremente conservadas, com muita gordura e animais com sinais de mastite, as amostras de leite que apresentaram S/P entre 15% e 30% foram considerados suspeitos. Devido às amostras estarem ricas em gordura, consideramos que o ponto de corte para amostras negativas para anti-MAP em leite atendeu a valores S/P iguais ou menores que 30%.

5.3 IMUNODETECÇÃO DO ANTÍGENO APA NO LEITE E FEZES

5.3.1 Processamento do leite

Devido o leite ser rico em gordura e esta poder interferir na imunodeteção da proteína, foi necessário retirá-la. Para tanto, foi utilizado uma técnica de extração de gordura segundo CALVANO *et al*, 2012. Em um eppendorf, foi adicionado 1ml de leite e centrifugado a 6000 rpm durante 30 min a 4°C. Após essa centrifugação, nas amostras que ainda apresentavam muito resíduo de gordura, o processo foi repetido. Em seguida o leite foi aliquoteado, congelado e descongelado apenas no momento de realização dos ensaios. Para eletroforese SDS-PAGE, *Western blotting* e imunoprecipitação, as amostras foram diluídas em água destilada 1:1.

5.3.2 Processamento das fezes

Aproximadamente 1g de fezes foi diluída em 3 ml de PBST 0.05% contendo um cocktail de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich). As amostras foram homogeneizadas sob agitação mecânica em vórtex. 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.

5.3.3 Imunoprecipitação e análise por imunoblotting

As amostras de leite e fezes foram previamente imunoprecipitadas, utilizando os Mabs anti-APA e proteína A/G-agarose (CALBIOCHEM) para concentrar e isolar o antígeno APA. A presença da proteína APA no leite foi verificada através da análise de amostras imunoprecipitadas por eletroforese SDS-PAGE e *Western blotting* utilizando protocolos convencionais.

Para imunoprecipitação, 500 µl do leite e/ou sobrenadante fecal foram submetidos à incubação com 6 µl de anticorpo monoclonal anti-rAPA MAP e 30 µl da proteína G-agarose *overnight*, sob agitação a 4°C. Após a incubação, a suspensão foi lavada 3 vezes por meio de centrifugação a 2500g por 5 min. O material precipitado foi ressuscitado em tampão de amostra e aplicado no gel de SDS-PAGE a 12%.

A eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE foi realizada segundo a metodologia de Laemmli (1970), em gel descontínuo, constituído de: gel separador (10% acrilamida, 0,2% bisacrilamida, 0,1% SDS, e 0,375 M tris pH 8,8), gel de concentração (5% acrilamida, 0,5% bisacrilamida, 0,1% SDS e 0,125 M tris pH 6,8) e tampão de corrida (25mM Tris, 192 mM glicina e 0,1% SDS pH 8,3). As corridas eletroforéticas foram realizadas no sistema de mini-gel (Dual Gel Caster Amersham Pharmacia Biotech), utilizando-se tampão de corrida sob 80 V constantes no gel de concentração e 110 V constantes no gel separador. A massa molecular das amostras de proteínas foi comparada com padrão de massas moleculares conhecidas.

Após eletroforese, o gel foi corado com corante Coomassie por 1h no agitador à temperatura ambiente para visualização das bandas de proteínas. Posteriormente, foi retirado o corante e o gel foi tratado com descorante (metanol 40%, ácido acético 10% em água destilada) sob agitação por 10 min. Após a retirada do descorante foi adicionado água destilada.

Para a transferência, após a corrida eletroforética, 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 1 hora e 40 minutos em constantes 250 mA. Após a transferência das proteínas, as membranas foram

incubadas com solução bloqueadora (5% de leite desnatado em PBS Tween (PBST)) durante 18 horas a 4°C.

No tratamento da membrana, foi utilizado o anticorpo primário IgY anti-APA (diluído 1:3000) MAP de gema de ovos dos animais imunizados, utilizado como anticorpo de detecção (SOUZA, 2015). Esse anticorpo foi diluído em PBST com gelatina 1% e levado a incubação no agitador por 1h em temperatura ambiente. Após lavagem (5 vezes por 5 min cada com PBST 0,05%), a membrana foi incubada sob agitação com anticorpo secundário, goat anti- chicken IgY- HRP (diluído 1:5000), por 1h em temperatura ambiente.

A revelação da membrana foi realizada através de 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 e 5 µl H₂O₂).

5.3.4 Elisa Sanduiche

Para detecção do antígeno APA em leite e nas fezes, as placas de microtitulação de ELISA foram sensibilizadas com 100µl/poço do anticorpo de captura - MAb anti-APA MAP (SOUZA et al., 2011) (2µg/ml) em presença do tampão de carbonato-bicarbonato (Na₂CO₃ 0,015M + NaHCO₃ 0,035M, pH 9,6) por 18h a 4°C. Após esse período de tempo, a placa foi lavada com 200µl de PBS 0,05% e tratada com uma solução de bloqueio (200µl) (PBST com gelatina a 0,05%) por 1h a 37°C. A solução de bloqueio é utilizada com a finalidade de evitar ligações inespecíficas com placa. Em seguida a placa foi lavada 4 vezes com PBS 0,05%

Após a lavagem, foi incubada com 100µl/poço do sobrenadante fecal e/ou amostra de leite devidamente processada, por 1h em temperatura ambiente. Após esse período, foi realizado uma nova lavagem com PBST 0,05% de 5 vezes e adicionado anticorpo de detecção IgY anti-APA (diluído 1:3000) MAP diluído em PBST com gelatina 0,5%, 100µl/poço, e incubado por 1h em temperatura ambiente. Após o período de incubação, houve uma lavagem de 5 vezes com PBST, e em seguida a amostra foi incubada com o anticorpo secundário, goat anti-chicken IgY- HRP (diluído 1:5000) (Calbiochem-Novabiochem Corp.) por 1 h

em temperatura ambiente. A reação foi revelada com a solução OPD (o-fenilenodiamina – 2HCl, ácido cítrico 20mM, fosfato de sódio 40mM), 100µl \poço, e foi interrompida adicionando-se 100µl de H₂SO₄ 3N por poço.

A leitura das placas foi realizada no espectrofotômetro a 492 nm (D.O 492nm). Como controle positivo, foi utilizado sobrenadante das fezes do animal I54 (SOUZA, 2015) e sobrenadante de cultura de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e como controle negativo meio 7H9.

5.4 TESTE BACTERIOLÓGICO

Segundo a metodologia descrita por STABEL (1997), foram pesados 3g de fezes e colocados em tubos falcon esterilizados contendo 30mL de água destilada autoclavada. Posteriormente, os tubos foram submetidos à agitação no vórtex por 5 minutos e, em seguida, mantidos em repouso, por 20 minutos, à temperatura ambiente, para sedimentação.

Após a sedimentação, o pellet foi ressuspenso com 30 mL de hexadecylpyridium chloride monohydrate à 0,75% (HPC - Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.) e mantido à temperatura ambiente (20-22°C), *overnigth*, para descontaminação.

Em seguida, o material foi centrifugado a 3000g, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1mL da solução descontaminante. Desta suspensão, 150µL foi semeada em agar CATTLETYPE® MAP HEYM inclinado (gentilmente cedido pelo Dr. Walter Oelemann- UFRJ), contendo ácido nalidíxico (50mg/mL) (Alamar Tecno- Científica Ltda, Diadema, SP, Brasil), cloridrato de vancomicina (50mg/mL) (Laboratório Teuto Brasileiro S/A, São Paulo, SP, Brasil) e anfotericina B (150mg/mL), e incubados a 37°C por 18 semanas. As observações de crescimento foram feitas semanalmente.

O restante da suspensão foi transferido para tubos de polipropileno de 15mL que foram mantidos a 8°C, por uma semana, para reinoculação em casos de possíveis contaminações nos tubos com meio de cultura.

6 RESULTADOS

6.1 SCREENING DOS ANIMAIS ATRAVÉS DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-MAP EM SORO E LEITE

Na primeira etapa deste trabalho, buscamos realizar um rastreio de vacas leiteiras nas fazendas da região com objetivo de selecionar animais com paratuberculose e coletar amostras do seu leite para posterior análise.

Em parceria com veterinários do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) da UENF e com consenso dos produtores rurais foi realizada avaliação veterinária dos animais nas diferentes fazendas da região Norte e Noroeste Fluminense (Tabela 1), Somente 2 vacas apresentaram sinais clínicos compatíveis com a PTB, tais como a diarreia intermitente e emagrecimento. Foram coletadas amostras de soro, fezes e leite destes animais (n=2) e de animais aparentemente saudáveis, maiores de 3 anos de idade, que foram selecionados aleatoriamente (n=94).

Tabela 1. Coleta de amostras de soro, fezes e leite em diferentes Regiões do Norte e Noroeste fluminense.

Regiões/Fazendas	Nº de amostras de soro, fezes e leite coletadas.
Italva (I)	6
Pádua (P)	18
Assentamento dos Zumbis (C)	12
Boa Ventura (BV)	45
Córrego da Chica (CC)	15

O sorodiagnóstico utilizando teste de ELISA indireto é o principal método de realizar um screening do gado para PTB. Para o estudo da ocorrência de anticorpos anti-MAP no soro de bovinos leiteiros, neste estudo nós utilizamos um kit comercial produzido na França, PARAS-4P ID-Vet Screen® *Paratuberculosis Indirect Screening kit*, de acordo com o protocolo do fornecedor.

Os resultados estão apresentados na Figura 1. Em Santo Antônio de Pádua - RJ, as amostras foram coletadas de 3 fazendas. De 8 animais testados, 4

bovinos (P1, P3, P6 e P8) foram soropositivos. Em Assentamento dos Zumbis (município Campos dos Goytacazes), todos os 12 animais foram soro-negativos, no entanto, foram encontrados 3 animais suspeitos (C1, C2 e C6).

Em Boa Ventura a coleta foi realizada em 4 fazendas, totalizando 45 animais. Soros de 20 desses animais foram testados, e 5 foram soropositivos (BV3, BV7, BV9, BV41 e BV42), sendo que desses 5 animais positivos, 3 são de uma mesma fazenda e os outros 2 de outra fazenda.

Em Córrego da Chica, 13 animais foram testados e, 5 bovinos foram soropositivos (CC8, CC10, CC11, CC12 e CC13). Os animais CC2, CC3, CC4, CC9 e CC14 foram considerados suspeitos, seguindo recomendações do fabricante para avaliação dos resultados do teste ELISA, sendo que seus soros apresentaram valores abaixo do ponto de corte (70%;), mas entre 60% e 70%.

Em Italva, as amostras de soro, fezes e leite foram coletadas em 2 fazendas, e foram encontrados 4 animais soropositivos para detecção de anticorpos anti-MAP (animal I1, I2, I4 e I5) e um suspeito (I54).

Detecção de anticorpos anti-MAP nos soros de bovinos

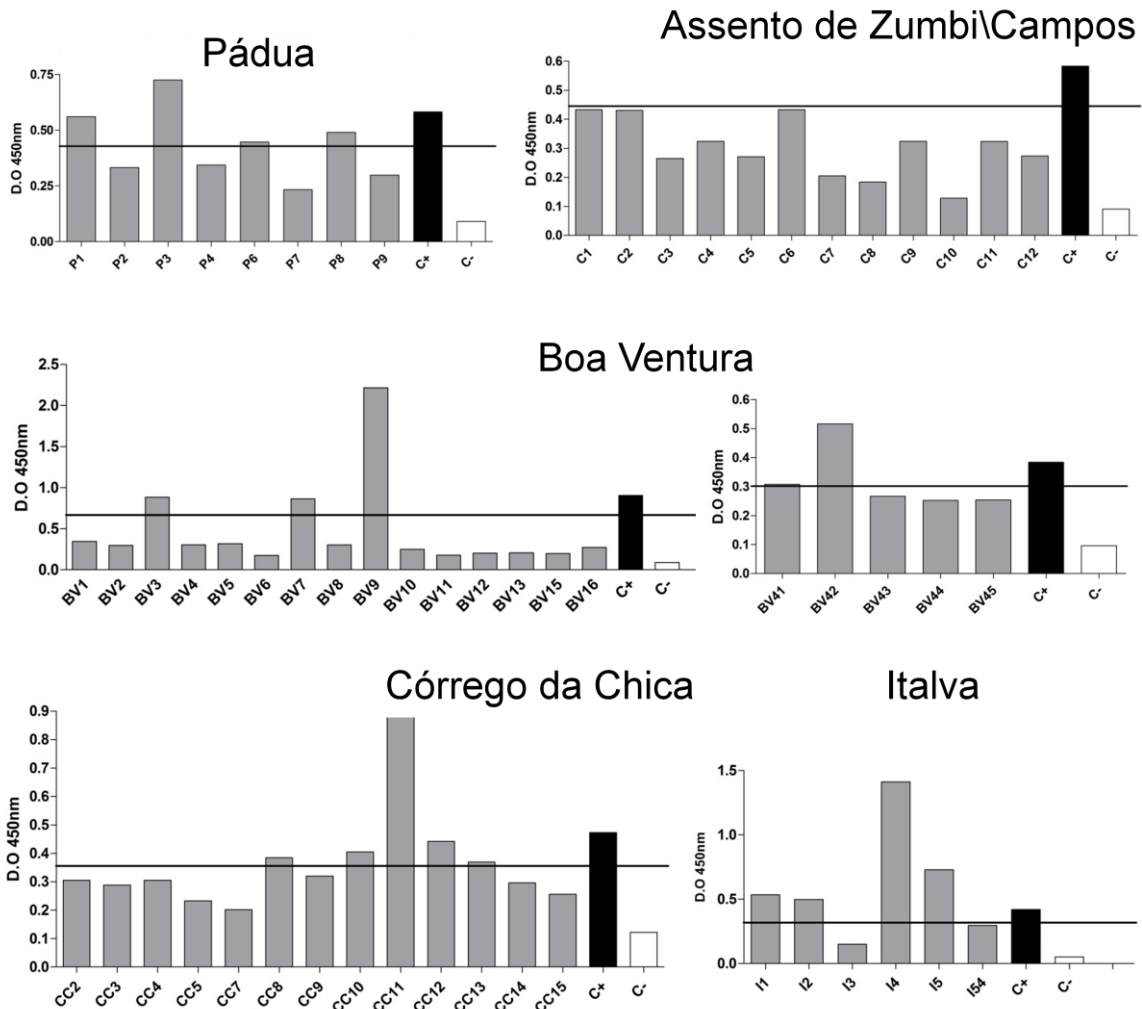


Figura 1. Detecção de anticorpos anti-MAP em soro de bovinos (sorodiagnóstico de PTB). As amostras de soros foram coletadas nas fazendas de diferentes municípios da região Norte e Noroeste Fluminense e testadas para presença de anti-MAP ELISA, utilizando kit comercial (ID SCREEN®, Paratuberculosis Indirect ELISA kit, ID Vet, França). A linha preta representa o ponto de corte da reação (determinado pelo fabricante). Valores iguais ou maiores que o ponto de corte foram considerados como positivos. Co(+) - controle positivo do Kit. Co(-) – controle negativo do Kit.

Os resultados obtidos revelam que a presença de anticorpos no soro do gado leiteiro na região de estudo foi 30,5% (Tabela 2).

Após a realização dos testes no soro dos animais, realizamos o teste para a detecção de anticorpos anti-MAP no leite desses animais.

Dos 4 animais soropositivos de Italva, as amostras de leite foram disponíveis de 3 e nenhum destes foi positivo no teste ELISA (Figura 2). Em Assentamento dos Zumbis, foram testados amostras de 2 animais, que foram suspeitos de acordo com dados do sorodiagnóstico, desses 2, 1 animal

apresentou ocorrência de anti-MAP no leite. Em Santo Antônio de Pádua - RJ, de 7 animais testados, 4 (P1, P3, P5 e P6) bovinos foram positivos no teste ELISA com utilização de leite. Em amostras de leite obtidos de 5 animais em Boa Ventura, 4 foram positivos (BV7, BV9, BV20 e BV42). Apenas um animal soropositivo (BV3) não apresentou presença dos anticorpos anti-MAP no leite.

Em Córrego da Chica, de 13 animais testados, detectamos cerca de 4 bovinos positivos no leite.

Detecção de anticorpos anti-MAP no leite de bovinos

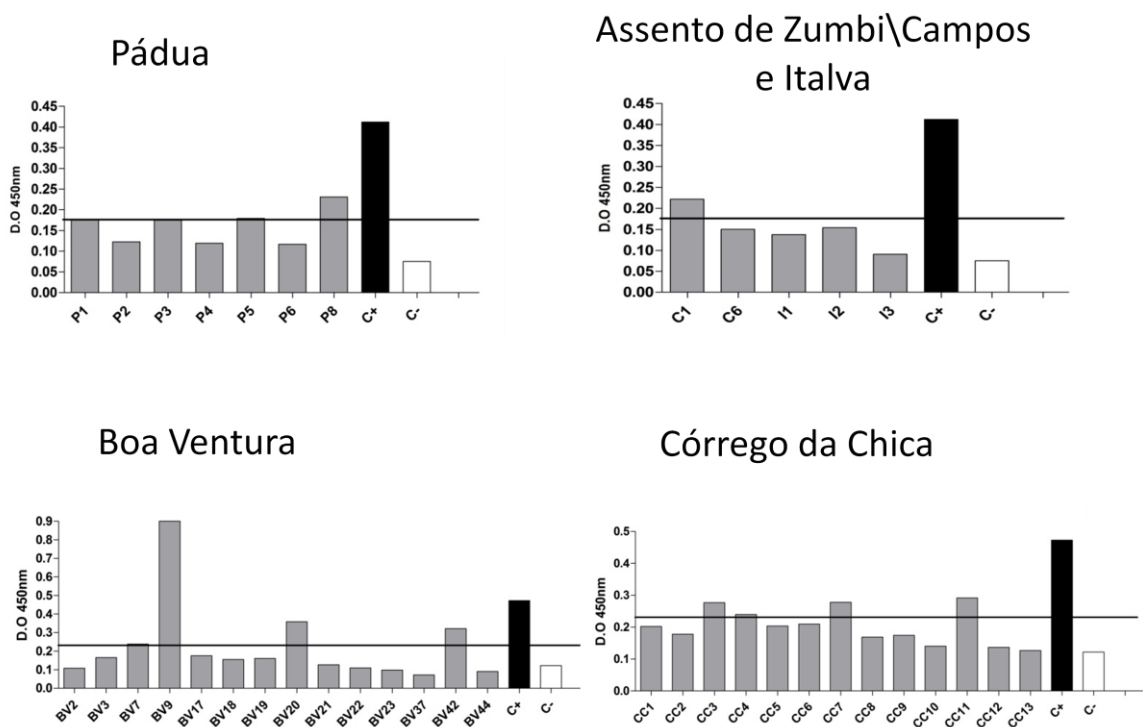


Figura 2. Detecção de anticorpos anti-MAP em leite de bovinos (diagnóstico de PTB). As amostras de leite de bovinos foram coletadas nas fazendas de diferentes municípios da região Norte e Noroeste Fluminense e testadas para presença de anti-MAP ELISA, utilizando kit comercial (ID SCREEN®, Paratuberculosis Indirect ELISA kit, ID Vet, França). A linha preta representa o ponto de corte da reação (determinado pelo fabricante). Valores iguais ou maiores que o ponto de corte foram considerados como positivos. Co(+) - controle positivo do Kit. Co(-) - controle negativo do Kit.

Os resultados do teste de leite por ELISA revelam ocorrência de anticorpos anti-MAP de 13 animais em 39 testados, com uma ocorrência de 33,3% de anticorpos anti-MAP (Tabela 2).

Tabela 2: Detecção de vacas reagentes ao teste ELISA (Kit ID SCREEN®, Paratuberculosis Indirect ELISA kit, ID Vet, França) em rebanhos bovinos leiteiro da Região Norte e Noroeste Fluminense.

	Total de amostras de soro avaliadas	Número (%) de vacas soropositivas	Total de amostras de leite avaliadas	Número (%) de vacas positivas no leite
Italva (I)	6	4 (66,6%)	3	0 (0%)
Pádua (P)	8	4 (50%)	7	4 (57,1%)
Assentamento dos Zumbis(C)	12	0 (0%)	2	1 (50%)
Boa Ventura (BV)	20	5 (25%)	14	4 (28,6%)
Córrego da Chica (CC)	13	5 (38,5%)	13	4 (30,7%)
	N=59	18 (30,5%)	N=39	13 (33,3%)

Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstram que prevalência dos anticorpos anti-MAP no gado leiteiro da região, tanto nas amostras de soro quanto em leite, foi cerca de 30%,

Os resultados mais detalhados sobre cada um dos animais positivos para ocorrência dos anticorpos anti-MAP estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Identificação de animais promissores através do teste de Elisa (Kit ID SCREEN®, Paratuberculosis Indirect ELISA kit, ID Vet, França) em rebanhos bovinos leiteiros da Região Norte e Noroeste Fluminense

Animais suspeitos no soro	Animais soropositivos	Positivos no leite	Positivos no soro e no leite
—	I1	—	—
—	I2	—	—
—	I4	—	—
—	I5	—	—
I54	—	—	—
—	P1	P1	P1
—	—	—	—
—	P3	P3	P3
—	—	—	—
—	—	P5	—
—	P6	—	—
—	P8	P8	P8
—	BV3	—	—
—	BV7	BV7	BV7
—	BV9	BV9	BV9
—	—	BV20	—
—	BV41	—	—
—	BV42	BV42	BV42
—	—	CC3	—
—	—	CC4	—
—	—	CC7	—
—	CC8	—	—
—	CC10	—	—
—	CC11	CC11	CC11
—	CC12	—	—
—	CC13	—	—
CC14	—	—	—
C1	—	C1	—
C2	—	—	—
C6	—	—	—
N=5	N=18	N=13	N=7

Os dados apresentados na Tabela 3 mostram que 7 animais foram positivos para presença de anticorpos anti-MAP tanto no soro, quanto no leite, sugerindo que estes animais apresentam a infecção ativa e são promissores para novos experimentos direcionados na detecção do antígeno de MAP no leite e nas fezes dos animais infectados. Dentre este grupo de animais destacamos 2 animais (BV9 e CC11) que apresentaram elevados títulos de anticorpos, superior a todos os demais animais. Vale destacar que foram efetuadas várias coletas durante o decorrer de um ano e meio, de soro (2 coletas), leite e fezes (4 coletas) do animal BV9 em meses diferenciados e o mesmo continuou mantendo títulos elevados de anticorpos anti-MAP no soro e no leite (não mostrado).

Os animais listados na tabela 3 foram selecionados para próxima fase deste trabalho no intuito de detecção do antígeno APA nas amostras de leite e fezes através do teste de Elisa sanduiche (kit PTB-Detect) elaborado no LBR (UENF).

6.2 Imunodeteção do antígeno APA em sobrenadante fecal e em leite através de Elisa sanduiche

Como a presença do antígeno APA nas fezes de vacas com doença de Jonhe já foi demonstrada em estudos anteriores no nosso laboratório (Souza., 2015), neste trabalho, inicialmente, testamos as amostras de fezes, utilizando kit ELISA anti-APA desenvolvido no LBR. Como controle positivo foi utilizado a amostra de fezes do animal I54, anteriormente demonstrada ser positiva para APA fecal (Souza., 2015). Amostras fecais dessa vaca foram mantidas congeladas a -70 °C.

Os resultados obtidos no teste de Elisa sanduiche das fezes (Figura 3) demonstram que em amostras de dois animais foi detectada a presença do antígeno APA-MAP (animais BV9 e BV20). Devido o animal BV9 ter apresentado diarreia intermitente, além dos resultados positivos laboratoriais, este animal foi monitorado, com coleta de amostras diferenciadas no decorrer de um ano e meio (BV9/1; BV9/2; BV9/3 e BV9/4), permanecendo positivo. Amostras dos outros animais foram negativos neste teste.

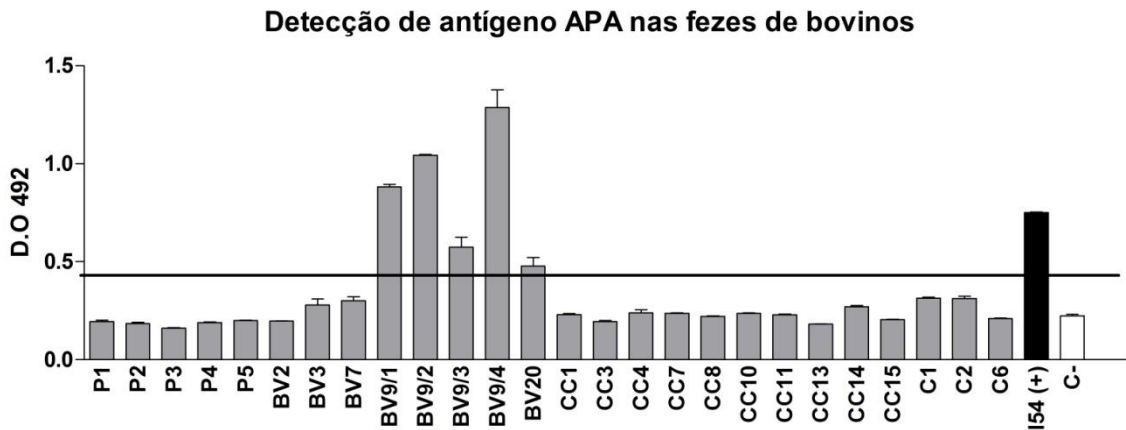


Figura 3. Imunodeteção do antígeno APA-MAP em sobrenadante de fezes de bovinos com PTB, suspeitos e sadios, através de ELISA sanduiche. Co(+) - controle positivo, sobrenadante de fezes de animal com PTB (I54). Co(-) – controle negativo, fezes de vaca sadia.

Após a realização do teste com as fezes, testamos as amostras de leite dos mesmos animais para presença do antígeno APA no leite, sugerindo que o antígeno que pode ser eliminado nas fezes, pode ser eliminado também no leite. Como controle negativo foi utilizado leite de vaca sadia. Como controle positivo foi utilizado amostra de fezes do animal I54, devido à falta do leite com APA.

Os resultados obtidos no teste de Elisa sanduiche do leite (Figura 4) demonstram que todas as amostras de leite foram negativas para detecção do antígeno APA-MAP, incluindo amostras de leite das vacas BV9 e BV20 (vacas que estão eliminando o antígeno APA nas fezes). Estes resultados sugerem que o antígeno pode estar presente no leite em quantidades menores em comparação com as fezes, não detectáveis por ELISA.

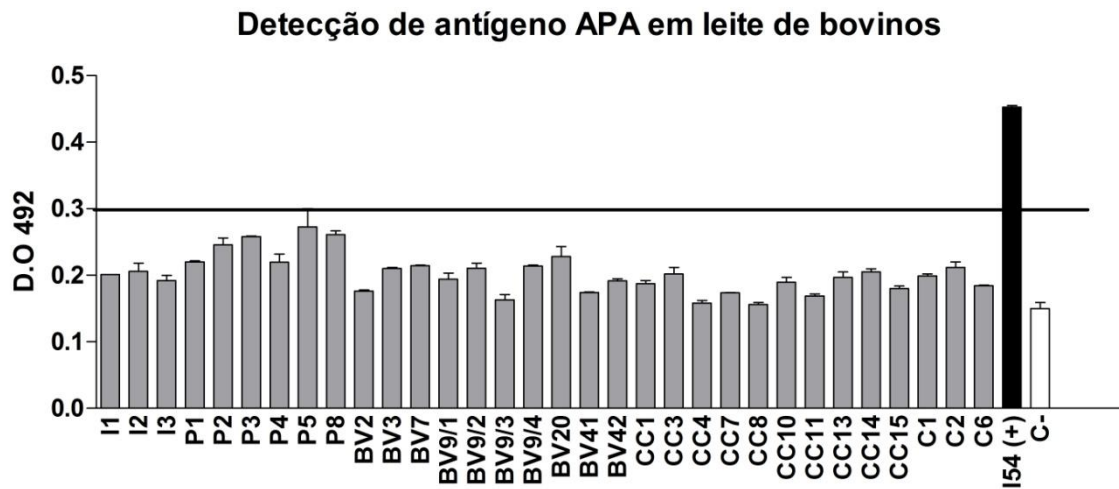


Figura 4. Imunodeteccção do antígeno APA-MAP em leite de bovinos com PTB, suspeitos e sadios, através de ELISA sanduiche. Co(+) - controle positivo, sobrenadante de fezes de animal com PTB (154). Co(-) – controle negativo, leite de vaca sadia.

Para verificar esta hipótese, realizamos testes de isolamento do antígeno através de imunoprecipitação.

6.3 Isolamento do antígeno APA em sobrenadante fecal e leite de animais suspeitos de PTB através de imunoprecipitação

Para confirmar os resultados obtidos no Elisa sanduiche, a presença do antígeno APA nas fezes e no leite foi verificada através de imunoprecipitação do antígeno de interesse e sua análise por *Western blotting*. As amostras de sobrenadantes de fezes e leite foram submetidas à imunoprecipitação prévia com objetivo de isolar e concentrar a proteína (Figuras 5 e 6).

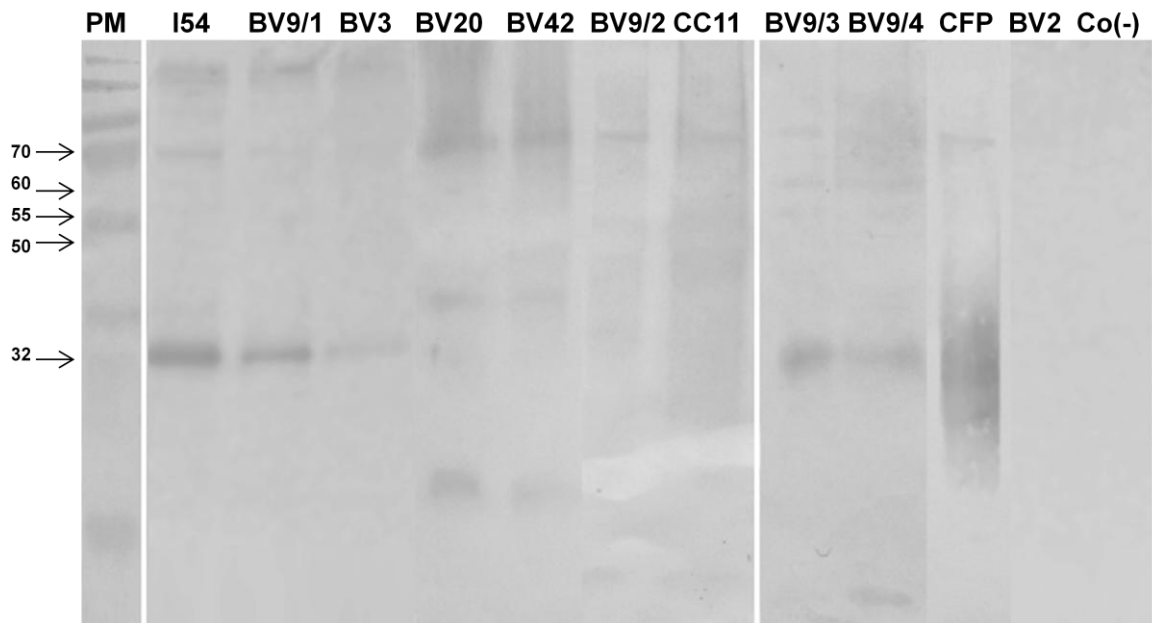


Figura 5. Imunodeteção do antígeno APA-MAP em sobrenadante fecal de bovinos com PTB, suspeitos e sadios através de *Western blotting*. Amostras de sobrenadantes foram imunoprecipitados com Mab anti-APA. Os precipitados obtidos foram analisados através de *Western blotting*, utilizando IgY anti-APA para tratamento de membrana. Co(+) - controle positivo (I54) e sobrenadante de cultura de *M. avium* (CFP), Co(-) - controle negativo, fezes de animal sadio.

A figura 5 demonstra a presença da proteína APA nas fezes com banda dupla de 60/70 kDa) dos animais BV9/1, BV3, BV20, BV42, BV9/2, CC11, BV9/3, BV9/4, além do controle positivo (I54 e CFP).

Após a obtenção dos resultados da imunoprecipitação com as fezes, realizamos também a imunoprecipitação prévia do leite. Uma banda de 70 kDa foi observada somente nas amostras BV9/2 e BV9/4, sendo que nas demais amostras a marcação foi negativa (Figura 6). Vale ressaltar que sem IP, as bandas da proteína APA não foram identificadas nas amostras de leite por *western blotting*.

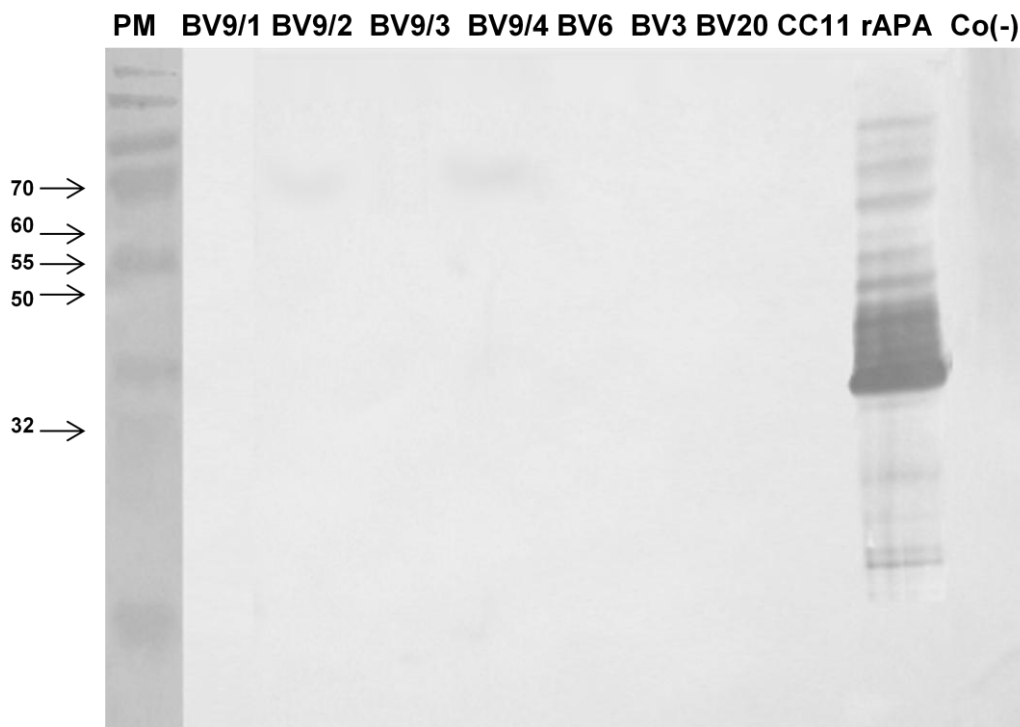


Figura 6. Imunodeteção do antígeno APA-MAP em leite de bovinos suspeitos e sadios através de *Western blotting*. Amostras de leite foram imunoprecipitadas com Mab anti-APA. Os precipitados obtidos foram analisados através de *Western blotting*, utilizando IgY anti-APA para tratamento de membrana. Co(+)- controle positivo (rAPA), Co(-) - controle negativo, fezes de animal sadio.

Estes dados demonstram que no leite, diferentemente das fezes, o antígeno APA está presente em quantidades muito pequenas, apenas nos animais com infecção ativa, que eliminam o antígeno (e provavelmente a bactéria) com as fezes.

Nas quatro amostras de leite coletadas do animal BV9 no decorrer de um ano e meio, a proteína APA foi encontrada após imunoprecipitação apenas nas amostras 2 e 4. Os resultados apresentados na Figura 3 demonstram que as amostras de fezes BV9/2 e BV9/4, coletadas nos mesmos dias que o leite, apresentaram maiores quantidades de APA nas fezes em comparação com as amostras BV9/1 e BV9/3, o que sugere maior atividade da infecção nessas datas. Nossa hipótese, que a proteína APA está sendo eliminada nas fezes junto com a micobactéria, ainda deve ser confirmada pelo método bacteriológico (isolamento de MAP em cultura fecal).

Por enquanto, os dados obtidos anteriormente em nosso laboratório demonstram a presença de MAP e do antígeno APA nas fezes do animal I54, o que foi confirmado pelo isolamento de cultura do MAP e dados de isolamento do

antígeno pelos métodos imunoquímicos. Isolamento de MAP das fezes dos outros animais positivos para presença da proteína APA nas fezes ainda está em andamento. Devido do lento crescimento da micobactéria, o teste de cultura é demorado (de 3-4 meses para obtenção de cultura).

7 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade da presença do antígeno APA, secretado por MAP, no leite de vacas com PTB. Para alcançar o objetivo, foi necessário obter amostras do leite de animais com essa enfermidade, na forma da doença clínica e subclínica. Entretanto, na nossa região, a prevalência da PTB no gado leiteiro é desconhecida e o diagnóstico dessa doença é precário.

Para selecionar animais para nosso estudo, nossa equipe com ajuda dos veterinários realizou avaliação médica das vacas leiteiras nas diferentes fazendas da região. Em 11 fazendas de 5 municípios diferentes da região, poucas vacas (4) apresentaram sinais clínicos compatíveis com sinais da PTB, como diarreia intermitente e emagrecimento.

Para confirmar o diagnóstico destes animais e detectar animais na fase subclínica da PTB, partimos para o sorodiagnóstico da PTB através da utilização do kit de Elisa comercial (kit convencional PARAS-4P ID-Vet Screen®, França) para rastrear animais com anticorpos anti-MAP no soro e, posteriormente, no leite de animais soropositivos. O teste de ELISA indireto é o principal método de triagem dos rebanhos bovinos com PTB (Ayele *et al.*, 2005).

Na segunda etapa, os animais positivos no ELISA do soro e/ou no leite, foram avaliados para a presença do antígeno APA nas fezes e leite utilizando novos métodos imunquímicos desenvolvidos em nosso laboratório. Foram coletadas amostras dos animais com sinais clínicos e de animais aparentemente saudáveis, maiores de 3 anos, que foram selecionados aleatoriamente.

Os resultados obtidos no teste de ELISA indireto demonstram que 30,5% das amostras de soro e 33,3% de leite testados foram positivos para anticorpos anti-MAP. Os resultados demonstram um acordo moderado entre os dados de soro e do leite, pois algumas amostras mostraram-se positivas apenas no soro ou apenas no leite, com um total de 7 amostras positivas em ambos. Nossos dados estão de acordo com os dados de Lombard *et al.*, (2006) obtidos durante um triagem do gado leiteiro para PTB nos EUA, que revelou concordância moderada entre dados obtidos em ELISA indireto do soro e leite (4,2 e 2,7% amostras positivas, respectivamente), demonstrando, no entanto, uma similaridade dos testes em termos de custo, tempo e sensibilidade de ambos.

Os animais positivos no teste de ELISA indireto foram selecionados para próxima fase do trabalho direcionado na detecção do antígeno APA de micobactéria em fezes e leite destes animais.

Nos trabalhos anteriores em nosso laboratório, foi demonstrado que a proteína APA secretada por MAP está presente nas fezes de bovinos leiteiros com Doença de Johne (Souza, 2015) e pode ser utilizada como um biomarcador dessa doença. A proteína pode ser detectada e isolada de fezes destes animais através de métodos imunológicos com utilização dos anticorpos específicos anti-APA produzidos no LBR (Souza *et al.*, 2011). Neste trabalho, foi utilizado o kit ELISA sanduiche anti-APA produzido anteriormente.

Como resultado, utilizando esse novo kit com amostras de sobrenadante de fezes de 23 animais soropositivos e suspeitos, foram detectados 2 animais (BV9 e BV20) positivos para presença do antígeno APA em fezes. Vale destacar o animal BV9, do qual foram coletados 4 amostras em meses diferentes e todas amostras testadas foram positivas. A quantidade da APA detectada em fezes coletadas em datas diferentes estavam oscilando, sendo maiores na segunda e quarta coleta.

Um fato interessante é que este animal apresentava diarreia intermitente, que foi maior nos dias da segunda e quarta coleta, o que sugere ativação da infecção, que provavelmente pode aumentar a excreção de micobactéria e seus antígenos nas fezes. O animal BV9 apresentou também, outras características compatíveis com a PTB, tais como: idade de 7anos, maior intervalo entre partos que as demais vacas, quanto à produção de leite, ainda não apresentou queda relevante, no entanto, há períodos em que há redução.

O caráter intermitente de diarreia e de excreção do MAP nos animais infectados por MAP foi descrito anteriormente. Em estudos realizados por Mitchell *et al.*, (2015a e b), os autores explicam que uma grande proporção de vacas são capazes, através do sistema imunológico, de controlar a infecção, como é o caso de liberação intermitente do MAP, ora o animal piora e elimina maior quantidade de MAP, ora melhora e quase não elimina esse microrganismo ou, chega uma fase em que o sistema imunológico não consegue mais controlar, e este animal passa a ser um eliminador contínuo de MAP e seus antígenos.

Se a eliminação do antígeno APA em fezes em quantidades detectáveis está associada aos períodos de eliminação de micobactéria, ainda deve ser confirmada pelo método bacteriológico (isolamento de MAP em cultura fecal). Por enquanto, os dados anteriores obtidos no nosso laboratório demonstram a presença de MAP e do antígeno APA nas fezes do animal I54, o que foi confirmado pelo isolamento de cultura MAP e dados de isolamento do antígeno pelos métodos imunquímicos. Isolamento de MAP das fezes dos demais animais positivos para presença da proteína APA nas fezes ainda está em andamento. Devido ao lento crescimento da micobactéria, o teste de cultura é demorado (até 3-4 meses para obtenção de cultura).

Como o objetivo desse trabalho foi detectar e isolar a proteína APA no leite, servindo como nova ferramenta de diagnóstico antes *mortem*, as amostras de leite dos animais positivos foram testadas utilizando novo kit ELISA anti-APA, a fim de avaliar sua funcionalidade e sensibilidade com o leite, comparado as demais metodologias, como imunoprecipitação para isolamento da proteína.

No entanto, nas amostras de leite avaliadas, nenhum animal demonstrou estar secretando a proteína APA, o que sugere que a proteína secretada por MAP não está sendo eliminada no leite, diferentemente das fezes, ou, está sendo secretada em quantidade ínfima, a ponto de não ser detectado através desse novo kit.

Uma vez que não detectamos a proteína APA através do novo kit, submetemos as amostras de fezes e leite de animais suspeitos a uma imunoprecipitação prévia com a finalidade de concentrar ao máximo a proteína de interesse (APA).

Através dos métodos de imunoprecipitação e análise do complexo imunoprecipitado por *Western blotting*, conseguimos detectar a proteína APA nas fezes de todos animais que apresentaram resultados positivos em ELISA anti-APA fecal, e ainda em alguns animais que no Elisa sanduiche das fezes mostraram-se negativos, como BV3 e CC11, o que demonstra que a imunoprecipitação prévia das amostras aumenta a sensibilidade dos testes imunquímicos na detecção do antígeno.

A utilização da imunoprecipitação nos testes de leite permitiu detectar a proteína APA nas amostras de um único animal (BV9). Foi detectada uma banda

de 70 kDa, que foi observada somente nas amostras de segunda e quarta coleta, sendo que nas demais amostras a marcação foi negativa. Estes dados estão de acordo com os dados de ELISA sanduiche das fezes que demonstraram maiores quantidades da APA eliminadas nas fezes nessas datas.

Estes dados sugerem que a proteína APA está sendo secretada em menores quantidades no leite do que nas fezes, que pode ser detectada somente nos animais com a infecção ativa e após concentração do material. Uma vez que o local acometido pela infecção é o intestino, logo haverá maior quantidade de MAP sendo eliminado nas fezes do que no leite. Sendo assim, a proteína secretada por esse microrganismo será encontrada em maiores quantidades e mais facilmente nas fezes do que no leite.

O conhecimento sobre os fatores que influenciam a quantidade de MAP sendo eliminado no leite ainda é escasso. Sabe-se que a excreção do MAP no leite e conseqüentemente seus antígenos, como por exemplo, a proteína APA, pode ser influenciado pelo estágio de infecção, com maior grau de eliminação ocorrendo nos estágios clínicos da PTB e quantidades muito pequenas ou mesmo indetectáveis de MAP eliminado nos estágios iniciais (STABEL *et al.*, 2014).

A não detecção da proteína APA nas demais amostras de leite também pode ser devido o MAP ser lançado tanto no leite como no colostro, preferencialmente por vacas em estágios avançados da doença e no início da lactação de acordo com Stabel *et al.*, 2014, o que pode não ser o caso dos animais submetidos aos testes, no entanto, é bem favorável o animal BV9 estar entrando em um estágio mais avançado da doença.

Quanto à lactação, a última coleta (BV9/4) foi no período pós-parto, o que provavelmente contribui para maior eliminação do MAP, devido ao estresse que o animal vive, uma vez que este é um fator desencadeante para eliminação do MAP e manifestação dos sinais clínicos da doença (ACYPRESTE *et al.*, 2005). Importante, que na amostra de quarta coleta foi encontrada maior quantidade da APA nas fezes e no leite.

Os métodos imunológicos para detecção da proteína APA em fezes ou leite (imunoprecipitação e particularmente ELISA sanduiche) são métodos rápidos e baratos, eliminam a necessidade do sacrifício de animais para a realização de exames histológicos post-mortem. Entretanto, os resultados obtidos revelam que

o uso do novo kit ELISA anti-APA não é ideal para detecção da APA nas amostras de leite, pois, não é sensível o suficiente para detectar pequenas quantidades da proteína APA que podem estar presente no leite.

Dessa forma, é mais relevante o uso do kit para amostras de sobrenadante de fezes, o que já foi demonstrado por Souza *et al.*, (2015) como uma ferramenta muito útil para o diagnóstico da PTB.

8 CONCLUSÃO

- Os resultados de detecção da proteína APA no leite (ELISA sanduiche), diferentemente das fezes foram negativos, o que demonstra que o antígeno, se está presente no leite, encontra-se em menores quantidades que nas fezes;
- A utilização da Imunoprecipitação permitiu detectar o antígeno APA em amostra de leite, confirmando que o antígeno pode estar presente no leite dos animais com infecção ativa, mas em quantidade ínfima;
- Para o diagnóstico da PTB, a detecção do antígeno APA no leite não é viável, uma vez que este pode estar presente em concentrações mínimas, a ponto de não ser detectado;
- O uso de amostras de fezes para detecção do antígeno APA continua sendo a melhor opção para desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico da PTB.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ALEXEJEFF-GOLOFF, N. A., 1929. Zur Frage der Pathogenese und Bazillenausscheidung bei Rinderparatuberkulose. Zeitschrift für Infektionskrankheiten, Parasitaerkrankheiten und Hygiene der Haustiere 36, 313–317. **Abstracted in Journal of Comparative Pathology** 48:81– 82.

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.

AYELE, W. Y., SVASTOVA, P., ROUBAL, P., BARTOS, M., & PAVLIK, I. 2005. *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Cultured from Locally and Commercially Pasteurized Cow's Milk in the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, 71(3),1210–1214. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1210-1214.2005>

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.

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.

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

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.

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.

CALVANO, C. D., MONOPOLI, A., LOIZZO, P., FACCIA, M., & ZAMBONIN, C. 2012. Proteomic approach based on MALDI-TOF MS to detect powdered milk in fresh cow's milk. **Journal of agricultural and food chemistry**, 61(8), 1609-1617.

CAZER, C. L., MITCHELL, R. M., CICCIONI-HOGAN, K. M., GAMROTH, M., RICHERT, R. M., RUEGG, P. L., & SCHUKKEN, Y. H. 2013. Associations between *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis antibodies in bulk tank milk, season of sampling and protocols for managing infected cows. **BMC veterinary research**, 9(1), 234.

CHIODINI, R. J., VAN KRUININGEN, H. J., MERKAL, R. S., THAYER, W. R., & COUTU, J. A. 1984. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, 20(5), 966-971.

CLARKE R.G., GRIFFIN J.F.T. & MACKINTOSH C.G. 2010. Johne's disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in red deer (*Cervus elaphus*): an histopathological grading system and comparison of paucibacillary and multibacillary disease. **N. Z. Vet. J.** 58(2):90-97.

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.

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

CUNHA, M. F., & BALLUS, C. A. 2009. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: uma preocupação para a indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 64(366), 3-11.

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.

DAVID, M. B. D. A., DIRVEN, M., AND VOGELGESANG, F. 2000. The impact of the new economic model on Latin America's agriculture. **World Development**, 28(9), 1673–1688.

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.

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.

ELTHOLTH, M. M., MARSH, V. R., VAN WINDEN, S., & GUITIAN, F. J. 2009. Contamination of food products with *Mycobacterium avium* paratuberculosis: a systematic review. **Journal of Applied Microbiology**, 107(4), 1061-1071.

ESPESCHIT, I.F., SCHWARZ, D.G.G., FARIA, A.C.S. SOUZA, M. C. C., PAOLICCHI, F. A., JUSTE, R. A., CARVALHO, I. A., MOREIRA, M. A. S. 2017. Paratuberculosis in Latin America: a systematic review. **Trop Anim Health Prod**, 49: 1557. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1385-6>.

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.

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., HITCHINGS, E. I., MCCARTNEY, A., FERGUSON, F., & ROWE, M. T. 2002. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. **Applied and environmental microbiology**, 68(2), 602-607.

GRANT, I. R. (2005). Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. **Journal of applied microbiology**, 98(6), 1282-1293. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02598.x.

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.

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

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.

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.

KURADE N.P., TRIPATHI B.N., RAJUKUMAR K. & PARIHAR N.S. 2004. Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Vet. Pathol.** 41:378-387.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685.

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.

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.

LOMBARD, J. E., T. M. BYREM, B. A. WAGNER, AND B. J. MCCLUSKEY. 2006. Comparison of milk and serum enzyme linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. **J. Vet. Diagn. Invest.** 18:448–458.

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

MAROUDAM, V., MOHANA SUBRAMANIAN, B., PRAVEEN KUMAR, P., DHINAKAR RAJ G. 2015. Paratuberculosis: Diagnostic Methods and their Constraints . **J Veterinar Sci Technol** 6:259. doi:10.4172/2157-7579.1000259.

MCSPADDEN, K., CAIRES, K., & ZANELLA, R. 2013. The effect of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis exposure on animal health. **Acta Scientiae Veterinariae**, 41(1), 1-10.

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

MITCHELL, R. M., Y. H. SCHUKKEN, A. P. KOETS, M. F. WEBER, D. BAKKER, J. R. STABEL, R. H. WHITLOCK, AND Y. LOUZOUN. 2015a. Differences in intermittent and continuous fecal shedding patterns between natural and experimental *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in cattle. **Vet. Res.** 46:66. doi: 10.1186/s13567-015-0188-x.

MITCHELL, R. M., R. H. WHITLOCK, Y. T. GROHN, Y. H. SCHUKKEN, Y. T. GROHN, AND Y. H. SCHUKKEN. 2015b. Back to the real world: Connecting models with data. **Prev. Vet. Med.** 118:215–225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.12.009>.

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.

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.

OIE 2010. World Organization for Animal Health. Disponível em http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf
Acessado em 15 Abril 2016.

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.

ORTIZ, M.M., ACOSTA, A.M., ACOSTA, G.R. AND ZUMARRAGA, M.J. 2009. Primer informe de aislamiento de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis en el Perú SENASA, 1–8.

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

PAOLICCHI, F., CIRONE, K., MORSELLA, C. AND GIOFFRE, A. 2012. First isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from commercial pasteurized milk in Argentina, **Brazilian Journal of Microbiology**, 43, 1034–1037.

PARK, H. T., YOO, H. S. 2016. Development of vaccines to *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis infection. **Clin Exp Vaccine Res.** Jul;5(2):108-116. <https://doi.org/10.7774/cevr.2016.5.2.108>.

PATEL, A., & SHAH, N. 2011. *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis—Incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 44(6), 473-479.

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

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

SALEM, M., HEYDEL, C., EL-SAYED, A., AHMED, S. A., ZSCHÖCK, M., & BALJER, G. 2013. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: an insidious problem for the ruminant industry. **Tropical animal health and production**, 45(2), 351-366.

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

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.

SMITH, R. L., GRÖHN, Y. T., PRADHAN, A. K., WHITLOCK, R. H., VAN KESSEL, J. S., SMITH, J. M., SCHUKKEN, Y. H. 2016. The effects of progressing and non-progressing *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection on

milk production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 99(2), 1383–1390. <http://doi.org/10.3168/jds.2015-9822>.

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.

SOUZA, G. S. 2015. Desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico da paratuberculose em fezes de bovinos. Tese de Doutorado no Curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ. 94p.

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.

STABEL, J. R.; BRADNER, L.; ROBBE-AUSTERMAN, S., & BEITZ, D. C. 2014. "Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into milk and colostrum of naturally infected dairy cows," **Journal of Dairy Science**, vol. 97, no. 10, pp. 6296–6304.

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.

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.

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

TOWBIN, H., STAHELIN, T., & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354.

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

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.

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

YAMASAKI, E. M., BRITO, M. F., MOTA, R. A., MCINTOSH, D., & TOKARNIA, C. H. 2013. Paratuberculosis in ruminants in Brasil: a review. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(2), 127-140.

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