

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TESTES IMUNOQUÍMICOS PARA O
DIAGNÓSTICO DA PARATUBERCULOSE BOVINA EM FEZES: TESTE RÁPIDO
E ELISA**

LANNA DE OLIVEIRA CORREDOURO PEREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes – RJ,

Fevereiro de 2026

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TESTES IMUNOQUÍMICOS PARA O
DIAGNÓSTICO DA PARATUBERCULOSE BOVINA EM FEZES: TESTE RÁPIDO
E ELISA**

LANNA DE OLIVEIRA CORREDOURO PEREIRA

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

Orientadora: Profa. Dra. Elena Lassounskaia

Coorientadora: Dra. Giliane da Silva de Souza

Campos dos Goytacazes – RJ,

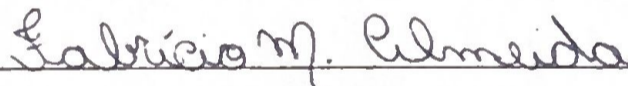
Fevereiro de 2026

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TESTES IMUNOQUÍMICOS PARA O
DIAGNÓSTICO DA PARATUBERCULOSE BOVINA EM FEZES

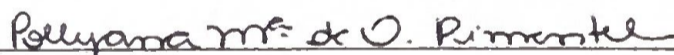
LANNA DE OLIVEIRA CORREDOURO PEREIRA

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

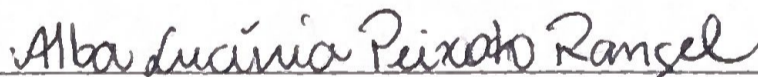
Comissão examinadora:



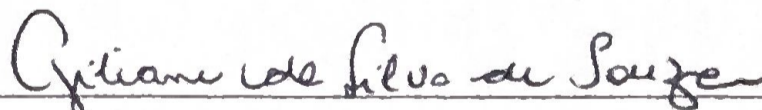
Fabrício Moreira Almeida, Dr., UENF



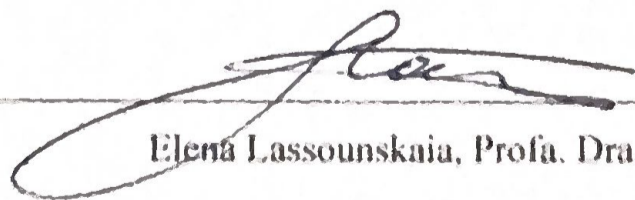
Pollyana Maria de Oliveira Pimentel, Profa. Dra., UFF



Alba Lucínia Peixoto Rangel, Profa. Dra., UENF



Giliane da Silva de Souza, Dra., Imuno X-press



Elena Lassounskaia, Profa. Dra., UENF

“³ Sim, coisas grandiosas fez o Senhor por nós, por isso estamos alegres.”

Salmos 126:3

A Jesus, aquele que me é suficiente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por toda força, graça e renovo dispensados durante essa jornada que foi o mestrado. Ele tem me guiado e conduzido até aqui, toda honra e glória sejam dadas a Ele.

A minha irmã e melhor amiga, Caroline, que por vezes me acompanhou nas idas até a UENF aos finais de semanas, que ouviu todos os desabafos sobre experimentos fracassados, por todas as lágrimas enxugadas em momentos de tristeza e por todos os sorrisos que você é especialista em arrancar dos meus lábios. Obrigada por me ajudar a suportar a jornada, a vida é muito mais alegre com você.

Aos meus avós, Ioleni e Braz Corredouro, por todo amor, investimento e incentivo nos estudos desde os anos iniciais até aqui. Obrigada por me impulsionarem e me proporcionarem mais do que tiveram.

Aos meus pais Liliane e Enéias Pereira, por todo apoio e incentivo, amor, carinho, todos os conselhos e orações e por comemorarem cada etapa do processo comigo. Obrigada por tudo, mas principalmente por sempre estarem lá e ouvirem sobre cada parte do trabalho mesmo sem entender nada e ainda contarem para os outros com tamanho orgulho e brilho nos olhos.

Ao meu namorado João Victor Maciel por todo apoio e incentivo, por opinar na montagem das minhas apresentações, por me ouvir falar de cada experimento nos mínimos detalhes e tentar entender (mesmo não entendendo muita coisa no fim das contas), por todo amor e carinho, por tornar o último ano do mestrado mais leve e um dos melhores anos da minha vida. Mas, principalmente por acreditar em mim de uma forma que nem eu mesma acredito.

A minha coorientadora, Giliane, pela amizade, companheirismo, todos os ensinamentos e conselhos; por ter acreditado na minha capacidade e investido tempo e recursos do projeto. Essa trajetória não seria a mesma sem você. Obrigada por ser minha mãe científica e me ensinar a caminhar com as próprias pernas.

A minha orientadora, Elena, por ter acreditado na minha capacidade e por todos os ensinamentos e tempo dispensados. Cada dúvida sanada, protocolo revisado, correções e

risadas foram essenciais para que este dia chegasse. À você deixo registrado o meu muito obrigada, sua alegria é contagiante.

A equipe de extensão do nosso projeto Paratuberculose Bovina, os veterinários Rafael, Amanda, Kellen. Aos alunos voluntários, Júlia e Fábio Hugo. Obrigada a todos por cada amostra coletada que chegou em minhas mãos.

A Vinicius Mussi por revisar com tanta prontidão, amor e carinho este trabalho. E também por todo companheirismo e amizade de laboratório.

Ao grupo “Elenetes”: Bárbara, Fabrício, Giliane, Sanderson, Vinicius, Verônica e Yasmin. Um grupo de parceiros e amigos. Muito obrigada!

Aos demais amigos e professores do LBR, Rita, Núbia, Fernando, Verônica, Juliana, Jorge, Prof.^a Thatiana, nossa saudosa Prof.^a Andrea, Prof.^a Alba, Prof.^a Rebeka, Liliani, Prof. Jorge, Prof Milton, Karol, Juliana, Eron. Obrigada pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos e irmãos: Júlia Freitas, Isabel, Lívia, Mairany, Débora, Monique, Laís, Júlia e Esmael. Pelo ombro amigo, pelas risadas, pelos choros, pelas orações, pelos rolês, pelas palavras liberadas sobre a minha vida, pelos conselhos e todo amor e carinho. Caminhar com vocês é transbordar Jesus, é uma honra. Obrigada por tanto!

As minhas companheiras de curso e amigas, Thais, Ana Flávia e Maysa, por toda ajuda, companheirismo, cumplicidade, desesperos pré-provas e surtos com as disciplinas. Essa jornada foi mais leve e suportável com vocês. Obrigada por tudo!

Aos professores Elena Lassounskaia, Dra. Giliane Souza, Alba Lucinia, Pollyana Maria e Dr. Fabrício Moreira por terem aceitado compor a banca do presente trabalho.

A UENF/FAPERJ, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A paratuberculose bovina (PTB) é uma infecção crônica intestinal causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). O desenvolvimento lento da doença dificulta seu diagnóstico por métodos laboratoriais convencionais. Em nosso laboratório, um teste inédito baseado em métodos imunquímicos, foi desenvolvido o *kit* ELISA PTB-Detect para um diagnóstico rápido da PTB em fezes bovinas. Este teste, que utiliza anticorpos monoclonais e policlonais para detectar um biomarcador da PTB nas fezes, o antígeno rico em alanina e prolina (APA) de micobactéria, é de fácil execução, sendo adequado para qualquer laboratório veterinário. Além disso, os anticorpos produzidos podem ser utilizados para desenvolvimento de um teste de tira para diagnóstico no local da propriedade rural (teste rápido). Entre objetivos deste projeto foi avaliação do desempenho do teste ELISA PTB-Detect no diagnóstico fecal da PTB em comparação com os métodos convencionais, e o desenvolvimento do protótipo de teste imunocromatográfico de fluxo lateral, usando o APA como biomarcador fecal. Amostras de soro e fezes foram coletadas de bovinos (n=249) em diferentes rebanhos leiteiros do estado RJ, e desempenho do novo teste ELISA PTB-Detect e dos testes convencionais (teste sorológico e teste RT-PCR comerciais) no diagnóstico da PTB foi comparado. Nossos resultados demonstram que o *kit* ELISA PTB-Detect, apresentou desempenho conservador comparado aos métodos convencionais de diagnóstico laboratorial dessa doença, evidenciando a importância da continuidade de sua validação. Entretanto, nas regiões de baixa prevalência da PTB, incluindo a nossa região de coleta, um número maior de animais deve ser avaliado para obter o resultado conclusivo. Para atender o objetivo de desenvolvimento do teste rápido, foi desenhado um protótipo baseado em um teste imunocromatográfico de fluxo lateral para detecção direta do antígeno APA nas fezes. Durante a corrida, o analito deve entrar em contato com um anticorpo anti-APA (IgY biotinizado) e um anticorpo monoclonal (IgG conjugado com ouro coloidal), e o complexo imune deve ser capturado pela estreptavidina a ser ligada à linha de teste da membrana de nitrocelulose. Um anticorpo secundário anti-IgG será imobilizado na linha de controle, com a finalidade de capturar o anticorpo monoclonal (mAb) conjugado. Primeiramente, os anticorpos monoclonais e policlonais anti-APA foram testados quanto a sua funcionalidade em ensaio de fluxo lateral no *kit* comercial *Universal Lateral Flow Assay*, comprovando a eficácia dos anticorpos nesse método. Partimos para produção de insumos para compor o teste

rápido. O protótipo foi testado com amostras positivas e negativas previamente confirmadas pelos testes convencionais para PTB. A intensidade da coloração foi registrada em uma escala de 0 a 3. Os resultados obtidos até o momento evidenciam, de forma estratégica, pontos críticos que orientam a otimização do protótipo e do protocolo experimental, refletindo o caráter rigoroso e iterativo do desenvolvimento tecnológico. Além disso, os dados preliminares já indicam um potencial promissor: após os devidos ajustes e validação, os ensaios imunoquímicos propostos têm capacidade de se consolidar como uma ferramenta inovadora, prática e eficiente para o diagnóstico da paratuberculose em fezes bovinas.

Palavras chaves: Paratuberculose; Imunodiagnóstico; Antígeno APA; Fezes.

ABSTRACT

Bovine paratuberculosis (PTB) is a chronic intestinal infection caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), and its slow disease progression makes diagnosis challenging using conventional laboratory methods. In our laboratory, a novel immunochemical-based test, the ELISA PTB-Detect kit, was developed for the rapid diagnosis of PTB in bovine feces. This assay employs monoclonal and polyclonal antibodies to detect a fecal biomarker, the alanine- and proline-rich antigen (APA) from mycobacteria, and is simple to perform, making it suitable for routine use in veterinary laboratories. Additionally, the antibodies produced can support the development of a strip-based rapid test for on-site diagnosis at farms. The objectives of this project included evaluating the performance of the ELISA PTB-Detect test for fecal diagnosis in comparison with conventional methods, as well as developing a prototype lateral flow immunochromatographic assay using APA as a fecal biomarker. Serum and fecal samples were collected from cattle (n = 249) across different dairy herds in the state of Rio de Janeiro, and the performance of the ELISA PTB-Detect kit was compared with conventional diagnostic methods, including commercial serological and RT-PCR tests. The results demonstrated that the ELISA PTB-Detect kit showed a conservative performance relative to conventional laboratory diagnostics, reinforcing the need for continued validation; moreover, in regions of low PTB prevalence, such as the study area, a larger sample size is required to obtain conclusive results. To address the development of a rapid test, a prototype based on a lateral flow immunochromatographic assay was designed for direct detection of APA in feces, in which the analyte interacts with a biotinylated anti-APA IgY and a monoclonal IgG conjugated to colloidal gold, forming an immune complex captured by streptavidin immobilized on the test line of a nitrocellulose membrane, while a secondary anti-IgG antibody is immobilized on the control line to capture the conjugated monoclonal antibody. Monoclonal and polyclonal anti-APA antibodies were initially validated for functionality in a lateral flow system using a commercial Universal Lateral Flow Assay kit, confirming their effectiveness, followed by the production of components for prototype assembly. The prototype was tested with positive and negative samples previously confirmed by conventional PTB diagnostic methods, and color intensity was recorded on a scale from 0 to 3. The results obtained so far strategically highlight critical points that guide the optimization of both the prototype and the experimental protocol, reflecting the rigorous and iterative nature of technological development. Furthermore, the preliminary data already indicate

promising potential: after appropriate adjustments and validation, the proposed immunochemical assays have the capacity to be established as an innovative, practical, and efficient tool for the diagnosis of paratuberculosis in bovine feces.

Keywords: Paratuberculosis; Immunodiagnosis; APA antigen; Feces.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Infecção por MAP via oral.	29
Figura 2. Esquematização estrutural de um teste imunocromatográfico (fluxo lateral). Fonte: CD Bioparticles.	32
Figura 3. Fluxograma do desenvolvimento e avaliação de testes imunocromatográficos rápidos. Adaptado de Kettler et al. 2004.	32
Figura 4. Folder informativo sobre a paratuberculose bovina.	47
Figura 5. Coleta de sangue e fezes e trabalho educativo com produtores de leite.	48
Figura 6. Purificação de anticorpos de captura IgG anti-APA e detecção IgY anti-APA para composição dos testes imunoquímicos.	50
Figura 7. Distribuição geográfica das propriedades e regiões de coleta de amostras biológicas de bovinos incluídos no estudo, localizadas nas regiões Baixada Litorânea e Norte e Noroeste Fluminense do estado do Rio de Janeiro.	51
Figura 8. Dados de quantificação do DNA amplificado nas amostras fecais bovinas por RT-PCR. Legenda com as cores e identificação das amostras logo abaixo.	54
Figura 9. Detecção do antígeno APA pelo kit ELISA PTB-Detect em sobrenadantes de fezes bovinas obtidos nas fazendas da região Norte Fluminense. C - controle negativo (fezes de animal sadio); C+ controle positivo (sobrenadante de cultura de MAP.	56
Figura 10. Verificação do funcionamento dos anticorpos monoclonal anti-APA e policlonal IgY em imunocromatografia.	60
Figura 11. Verificação do funcionamento dos anticorpos monoclonal anti-APA e policlonal IgY em imunocromatografia.	61
Figura 12. Esquema representativo do funcionamento do protótipo do teste imunocromatográfico PTB fecal RAPID.	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Detecção de paratuberculose nas diferentes mesorregiões do Rio de Janeiro por rastreio sorológico.	52
Tabela 2. Municípios onde foram detectados animais soropositivos pelo teste Elisa comercial.	52
Tabela 3. Distribuição dos resultados do RT-PCR fecal para detecção de <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> (MAP) em bovinos por mesorregião	55
Tabela 4. Distribuição dos resultados do RT-PCR fecal para detecção de <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> (MAP) em bovinos por município.	55
Tabela 5. Detecção do antígeno APA em fezes de bovinos com paratuberculose pelo método proposto ELISA PTB-Detect por município	57
Tabela 6. Detecção do antígeno APA em fezes de bovinos com paratuberculose pelo método proposto ELISA PTB-Detect por mesorregião	56
Tabela 7. Resultados comparativos dos métodos imunológicos e moleculares aplicados ao diagnóstico da paratuberculose bovina	58
Tabela 8. Estratégia atual de diagnóstico da PTB em diferentes cenários de doença e perspectivas de utilização dos novos testes imunoquímicos propostos para o diagnóstico em fezes.	68

LISTA DE ABREVIATURAS

APA – Antígeno Rico em Alanina e Prolina

APA-MAP – Antígeno proteico APA de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

BCA – Ácido bicinconínico (*Bicinchoninic Acid Assay*)

BSA – Albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)

CO₂ – Dióxido de carbono (*Carbon Dioxide*)

CP – *Conjugate pad*

Ct – *Cycle threshold*

DAB – 3,3'-diaminobenzidina

DC – Células dendríticas (*Dendritic Cells*)

DJ – Doença de Johne

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

DO – Densidade óptica

DMEM/F-12 – Meio Dulbecco modificado/F-12

DTH – Hipersensibilidade tardia (*Delayed-Type Hypersensitivity*)

ELISA – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

FAP – Fosfatase alcalina (*Alkaline Phosphatase*)

HRP – Peroxidase de rábano (*Horseradish Peroxidase*)

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

IFN- γ – Interferon gama (*Interferon gamma*)

IgG – Imunoglobulina G

IgY – Imunoglobulina Y

IS – Sequência de inserção (*Insertion Sequence*)

LFA – Ensaio de fluxo lateral (*Lateral Flow Assay*)

MAP – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

OD₄₅₀ – Densidade óptica a 450 nm

OIE / OMSA – Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health*)

OMS (WHO) – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

OPD – Ortofenilendiamina

PBS – Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PBST – PBS com Tween 20

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pH – Potencial hidrogeniônico

PoC – *Point-of-care*

PPD – Derivado proteico purificado (*Purified Protein Derivative*)

PTB – Paratuberculose bovina

PTB-Detect – ELISA sanduíche para detecção fecal de PTB

PTB-RAPID – Protótipo de teste rápido para PTB

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Paratuberculose Bovina: Histórico, Etiologia e Epidemiologia.....	19
2.2 Importância Econômica e Potencial Zoonótico da PTB.....	21
2.3 Diagnóstico da PTB: Métodos, Limitações e Desafios.....	24
2.4 Infecção por MAP e Biomarcadores Fecais (APA).....	28
2.5 Ensaio de Fluxo Lateral (Imunocromatografia).....	31
2.6 Desenvolvimento de testes rápidos.....	32
3 JUSTIFICATIVA.....	34
4 OBJETIVOS.....	36
4.1 Objetivo Geral.....	36
4.2 Objetivos Específicos.....	36
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5.1 Coleta de material biológico do gado com PTB.....	37
5.2 Descongelamento e cultivo dos hibridomas anti-APA-MAP.....	37
5.3 Produção do líquido ascítico.....	38
5.4 Descongelamento e processamento de amostras de imunoglobulinas IgY anti-APA produzidas anteriormente.....	39
5.5 Dosagem de proteínas pela construção da curva padrão BSA (Albumina Sérica Bovina).....	39
5.6 Eletroforese SDS-PAGE.....	39
5.7 Western Blotting.....	40
5.8 Sorodiagnóstico.....	40
5.9 Processamento de amostras de animais soropositivos e soronegativos.....	41
5.10 Imunodeteção de antígeno APA em sobrenadante fecal através de ELISA sanduíche (método proposto).....	41

5.11 Extração de DNA de <i>M. avium paratuberculosis</i> em amostras fecais	42
5.12 Detecção de DNA em amostras fecais por PCR em tempo real (VetMAX™ MAP Real-Time PCR).....	42
5.13. Testagem dos anticorpos monoclonal IgG anti-APA MAP e policlonal IgY anti-APA MAP quanto a seu potencial funcional em kit imunocromatográfico (<i>Univeral Lateral Flow Assay Kit – ab270537</i>).....	43
5.14 Idealização do protótipo da plataforma diagnóstica imunocromatográfica.....	44
5.15 Produção de insumos para teste rápido	44
6. RESULTADOS	47
6.1 Coleta de material biológico (sangue e fezes) em rebanhos com ou sem histórico de PTB e integração de ações extensionistas	47
6.2 Produção de anticorpos anti-APA de captura e de detecção para ensaios imunoquímicos de diagnóstico da paratuberculose	48
6.3 Caracterização da população estudada e distribuição geográfica das amostras	50
6.4 Perfil sorológico dos rebanhos avaliados por ELISA comercial	51
6.5 Diagnóstico Molecular da paratuberculose bovina por RT-PCR fecal	53
6.6 Detecção do antígeno APA em sobrenadantes fecais por ELISA sanduíche PTB-Detect (método proposto)	55
6.7 Avaliação do desempenho diagnóstico do ELISA sanduíche PTB-Detect em comparação aos métodos comerciais	58
6.8 Verificação da funcionalidade dos anticorpos que compõe o kit ELISA PTB-Detect em teste imunocromatográfico	60
6.9 Idealização de um protótipo para o teste PTB fecal RAPID (Imunocromatográfico).....	62
6.10 Produção de insumos para o teste rápido imunocromatográfico	63
7 DISCUSSÃO	65
8 CONCLUSÃO.....	70
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

A Paratuberculose bovina (PTB) é uma doença infecciosa crônica causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), que acomete principalmente ruminantes e causa grandes prejuízos econômicos à pecuária leiteira mundial. A infecção caracteriza-se por diarreia intermitente, perda progressiva de peso e queda acentuada na produção de leite, levando ao descarte precoce dos animais (WHITTINGTON *et al.*, 2019; LOMBARD, 2011).

Além das perdas produtivas, o MAP apresenta alta resistência no ambiente, podendo permanecer viável por longos períodos em água, solo e fezes, o que favorece a disseminação e dificulta o controle da doença (KENNEDY *et al.*, 2017). Estudos também sugerem uma possível associação entre o MAP e doenças intestinais humanas, como a Doença de *Crohn*, indicando potencial zoonótico (GARVEY, 2020; FELLER *et al.*, 2007).

O diagnóstico da PTB é considerado um dos principais desafios para o controle da patologia, especialmente pela eliminação intermitente do agente infeccioso e pela variabilidade da resposta imune dos hospedeiros (MOHAN & KUSHWAHA, 2024). Os métodos clássicos de diagnóstico, como a cultura bacteriana, embora específicos, são lentos e requerem meses para o isolamento do agente.

Já os testes moleculares, como o PCR e o PCR em tempo real, são sensíveis, mas demandam estrutura laboratorial avançada, mão de obra especializada e apresentam custo elevado, além de dependerem de *kits* importados (YAMASAKI *et al.*, 2013; WHITTINGTON *et al.*, 2019). Os testes sorológicos comerciais, por sua vez, embora amplamente utilizados, apresentam limitações na detecção de animais subclínicos devido à resposta humoral tardia, sendo assim amplamente utilizados para rastreio inicial nos rebanhos (BAUMAN *et al.*, 2016; STABEL, 1997).

Nesse cenário, os métodos imunológicos baseados na detecção direta de antígenos micobacterianos surgem como alternativas promissoras, por serem rápidos, de menor custo e mais adequados à realidade de campo (SOUZA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2018). Entre os antígenos estudados, destaca-se a proteína APA (Proteína Rica em Alanina e Prolina), uma glicoproteína secretada pelo MAP, com função de adesina e importante papel imunogênico

(SECOTT *et al.*, 2001; GIOFFRÉ *et al.*, 2009). Essa proteína é conservada entre micobactérias, mas apresenta epítomos espécie-específicos que a tornam um marcador diagnóstico altamente específico para MAP (SOUZA *et al.*, 2011).

Com base nesse potencial, o antígeno APA foi utilizado para o desenvolvimento de um kit de diagnóstico para a PTB no LBR/UENF: o kit ELISA PTB-*Detect*, destinado à detecção do antígeno em fezes de bovinos (SOUZA *et al.*, 2018).

A partir disso, buscamos a validação do kit ELISA PTB-*Detect* comparando sua eficácia com os métodos disponíveis no mercado, kit *VetMAX™ MAP Real-Time PCR* (EUA) e o kit ELISA comercial *PARAS-4P ID-Vet Screen® Paratuberculosis Indirect Screening* (França). Ademais, buscamos testar os anticorpos de captura e detecção produzidos em nosso laboratório através de um ensaio de fluxo lateral (*Universal Lateral Flow Assay Kit – ab270537*) para a potencial montagem de um teste imunocromatográfico, a fim de obter um diagnóstico rápido da PTB.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Paratuberculose Bovina: Histórico, Etiologia e Epidemiologia

Em 1800, Johne e Frothingham pensaram na PTB como sendo uma forma de tuberculose intestinal. Finalmente em 1895, pela primeira vez, o *Mycobacterim avium subsp. paratuberculosis* foi isolado do intestino de bovinos, na Alemanha. A partir disso foi descrita e nomeada a doença de Johne (CHIODINI *et al.*, 1984). Posteriormente, após o isolamento do microrganismo de fezes em 1910, a doença foi reproduzida experimentalmente, e assim, a bactéria causadora foi caracterizada como *Mycobacterim enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne* (TWORT, INGRAM, 1912; HERMON-TAYLOR *et al.*, 2000; YAMASAKI *et al.*, 2013). Após estudos e pesquisas, em 1990, recebeu a classificação taxonômica de *Mycobacterim avium subsp. paratuberculosis* pela estreita relação genética com *M. Avium* (CHIODINI *et al.*, 1984; YAMASAKI *et al.*, 2013).

A PTB é uma doença crônica que acomete vários animais, incluindo o estágio pré-clínico e a doença ativa, doença de *Johne* (DJ), que representa um dos maiores problemas veterinários para os produtores da agropecuária industrial, em diversos países, bem como no Brasil. O primeiro caso relatado de DJ foi em 1800 na Alemanha, quando ainda acreditava-se

que era um tipo de tuberculose intestinal; e posteriormente foi descrita por Johne e Frothingham ao observarem perda de peso e diarreia crônica em uma vaca de seis anos. Desde então, a doença vem atingindo bovinos, outros ruminantes e diversos animais domésticos e selvagens ao redor do mundo (FELLER *et al.*, 2007; LOMBARD, 2011).

O MAP, pertencente ao gênero *Mycobacterium*, sendo caracterizado como um bacilo aeróbio, imóvel e não esporulado, Gram-positivo. Apresenta dimensões próximas de 2 µm por 0,5 µm e tem um alto teor de ácidos micólicos em sua parede celular, o que confere ao bacilo a resistência ao tratamento ácido-alcoólico e a resistência a antibióticos. Essa estrutura distinta dificulta o processo de extração de DNA em análises por reação em cadeia da polimerase (PCR), uma vez que torna a célula difícil de romper (BUITRAGO-LÓPEZ *et al.*, 2021; CUNHA; BALLUS, 2009; NUGENT *et al.*, 2011; YAYO AYELE *et al.*, 2001). Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA), todas características contribuem para resistência ao calor, ao frio e à dessecação, podendo sobreviver por longos períodos no solo (mais de um ano) e ainda mais tempo na água.

Levando em consideração seu genótipo, o MAP se diferencia das outras espécies de *M. avium* (subespécies *avium*, *hominissuis*, *silvaticum*) pela presença de um elemento de inserção (IS) denominado IS900 (HERMON-TAYLOR *et al.*, 2000; SONAWANE; NARNAWARE; TRIPATHI, 2016). Outra diferença entre essas micobactérias é que o MAP é mais exigente quando cultivado *in vitro*, uma vez que requer condições especiais, como o uso de meios de cultura próprios, como *Herrold Egg Yolk Medium* (HEYM), *Reid-Watson* ou *Lowenstein-Jensen* (LJ), com adição de micobactina, um quelante de ferro que aumenta a biodisponibilidade do ferro presente no meio, permitindo assim o crescimento fora do hospedeiro. (BARCLAY; EWING; RATLEDGE, 1985).

A maioria das espécies de *M. avium* possui um sideróforo, a micobactina, um quelante de ferro, que é um elemento essencial para a maioria das bactérias, e sua disponibilidade e seu sequestro estão associados à sobrevivência e à virulência bacteriana. Diferentemente de outras micobactérias, o MAP é incapaz de produzir a micobactina, o que o torna incapaz de sequestrar ferro do meio de cultura (BUITRAGO-LÓPEZ *et al.*, 2021; COCITO *et al.*, 1994; CUNHA; BALLUS, 2009). O meio de cultura indicado para isolamento e crescimento de MAP deve ser suplementado com micobactina J, 2mg/ml.

A patologia se caracteriza por uma enterite granulomatosa contagiosa, de lento desenvolvimento e fatal conforme sua progressão. A infecção crônica causada por MAP, comumente afeta ruminantes domésticos, entretanto, há registros de outras espécies de mamíferos afetados: gambás, coelhos, ouriços, gatos, ovinos e caprinos, incluindo primatas (COSTANZO *et al.*, 2012; HERMON-TAYLOR *et al.*, 2000; NUGENT *et al.*, 2011; YAMASAKI *et al.*, 2013).

Os dados obtidos até 2002 indicavam a prevalência da doença causada por MAP em vários países, como Estados Unidos, Austrália e em países europeus, incluindo a Alemanha, onde a patologia foi inicialmente descrita. Desde então espalhou-se por todo mundo sendo principalmente encontrada em países onde há indústria pecuária, tornando-se assim um problema mundial, com altas taxas de disseminação entre rebanhos na América do Sul e na Ásia (CHIODINI; VAN KRUININGEN; MERKAL, 1984; GOMES *et al.*, 2002; MAGALHÃES *et al.*, 2025). Em 2012, a PTB passou a ocupar o oitavo lugar na lista de doenças que devem ser notificadas à OMSA (Organização Mundial da Saúde Animal), e permanece sendo assim em 2026 (OMSA, 2025), como doença considerada de importância socioeconômica e/ ou de saúde pública nos países, e significativa no comércio internacional de animais e produtos de origem animal (YAMASAKI *et al.*, 2013).

2.2 Importância Econômica e Potencial Zoonótico da PTB

Estima-se que as perdas econômicas ao redor do globo decorrente dos casos endêmicos da PTB sejam superiores a 1,5 bilhão em dólares americanos por ano (SAMBA-LOUAKA *et al.*, 2018). Na indústria de laticínios, as perdas econômicas estão estritamente relacionadas com o impacto na produção e custos do controle da doença, entretanto, variam entre regiões. A PTB resulta em redução da produção de leite, problemas de fertilidade e eventual abate dos animais (VAN HULZEN *et al.*, 2011).

Ao analisarmos o impacto econômico da PTB a nível de rebanho, destacamos os custos de diagnóstico e monitorização da doença, custos de abate e substituição dos animais doentes, redução da taxa de conversão alimentar e aumento da susceptibilidade a comorbidades. Vale ressaltar que vacas portadoras da doença apresentam maior incidência de mastite clínica e subclínica, causando um aumento dos custos do tratamento por vaca e rebanho (MCKENNA *et al.*, 2006).

O impacto econômico da PTB a nível de rebanho irá variar de acordo com alguns fatores como: tamanho do rebanho, taxa de infecção, taxa de disseminação bacteriana, apresentação de sintomas clínicos e dos casos da doença clínica (GARVEY, 2020; WHITTINGTON *et al.*, 2019).

As perdas ocasionadas pela PTB podem ser ainda mais expressivas, uma vez que a fase subclínica da doença dificulta o rastreamento de animais infectados pelos testes diagnósticos atualmente disponíveis, os quais, em geral, baseiam-se em métodos sorológicos voltados à detecção da resposta imune humoral contra o MAP no organismo do animal (MCKENNA *et al.*, 2006).

Rasmussen e colaboradores, em 2011, estimaram que aproximadamente 1% da receita bruta do leite, que equivale a US\$ 33 por vaca, é perdido anualmente em rebanhos leiteiros infectados por MAP, tendo como principal causa a redução na produção e sendo maior em regiões caracterizadas por alta produção. Estima-se que anualmente o prejuízo causado pela PTB em rebanhos leiteiros é de US\$ 198 milhões nos Estados Unidos, US\$ 75 milhões na Alemanha, US\$ 56 milhões na França, US\$ 54 milhões na Nova Zelândia e entre US\$ 17 milhões e 28 milhões no Canadá. Sendo esta última uma das menores regiões produtoras de laticínios mundialmente (RASMUSSEN *et al.*, 2021).

Nas regiões consideradas principais produtoras de leite, a prevalência da infecção por MAP em nível de rebanho é de aproximadamente 50%, enquanto as perdas anuais por vaca variam entre US\$ 8,31 no Brasil a US\$ 81,53 no Japão com uma média ponderada de US\$ 32,84 por vaca por ano (RASMUSSEN *et al.*, 2021). Sendo que tais perdas econômicas no Brasil podem ser ainda maiores, devido à carência de informações sobre a prevalência da doença nas diferentes regiões do país e a respeito dos impactos econômicos por ela gerados a nível de rebanho, havendo ainda poucos estudos publicados sobre os impactos da PTB no Brasil.

Quanto a seu potencial zoonótico, estudos realizados apontam que MAP pode ser eliminado no leite da vaca com PTB, e o bacilo é capaz de sobreviver no leite pasteurizado e nos produtos lácteos como queijo coalho artesanal (CHIODINI *et al.*, 1984; FARIA *et al.*, 2014; KLEINWORT *et al.*, 2021). Dessa forma, MAP pode ser transmitido aos seres humanos pelo consumo de leite cru ou pasteurizado e, possivelmente, por outros produtos

lácteos como queijo (coalho e ricota) (FARIA *et al.*, 2014; FELLER *et al.*, 2007; KLEINWORT *et al.*, 2021; WADDELL *et al.*, 2016). Recentemente foi observada a presença de MAP em amostras de queijo coalho artesanal adquiridas em estabelecimentos comerciais do Estado de Pernambuco, sendo que 27,5% das amostras submetidas a qPCR para a região IS900 do MAP foram positivas e o teste bacteriológico demonstrou uma média de 195,9 unidades formadoras de colônia (UFC) de MAP por grama de queijo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2019).

Em 1913, o cirurgião e cientista Dalziel relatou que os sintomas apresentados por vários de seus pacientes se assemelhavam fortemente às manifestações clínicas observadas em bovinos portadores da doença de Johne. Desde então, passou a ser considerado o primeiro cientista a levantar a hipótese de que o MAP pode ser de fato responsável pela inflamação intestinal crônica observado no intestino humano (Doença de Crohn) (NASER *et al.*, 2014).

A DC, descrita em 1769, se caracteriza por uma íleocolite granulomatosa crônica de seres humanos, afeta principalmente adultos jovens com idades entre 17 e 52 anos. A etiologia ou causa da doença ainda permanece desconhecida, no entanto, diversas teorias apontam que a DC pode ser causada por uma resposta imunitária desregulada em hospedeiro geneticamente susceptível, isto somado a fatores ambientais. O acúmulo de evidências apoia uma associação entre infecção por MAP e a DC em humanos. (CHIODINI *et al.*, 1984; HERMON-TAYLOR *et al.*, 2000; NASER *et al.*, 2014).

Naser e colaboradores (2014) revisaram dados de 60 estudos, onde demonstraram a detecção e isolamento de MAP via PCR e técnicas de cultura, concluindo que, em pelo menos 30% a 50% dos casos de pacientes com DC, o agente etiológico da PTB foi isolado (NASER *et al.*, 2014). Além disso, pacientes com DC apresentaram resposta sorológica contra MAP, e a observação da sobreposição significativa dos genes associados à susceptibilidade à DC e a micobactéria causadora da PTB.

No entanto, o papel da MAP na etiologia da DC não é definido (MCNEES *et al.*, 2015; NAKASE *et al.*, 2006). Ademais, existe uma possível ligação entre o MAP e diversas outras doenças autoimunes, como diabetes tipo 1, artrite reumatoide e esclerose múltipla. Essa possível associação é atribuída ao mimetismo molecular, utilizado pela micobactéria como mecanismo de evasão frente ao sistema imunológico (BO *et al.*, 2019; GARVEY, 2018).

Atualmente, Vuyyuru e colaboradores (2026) investigaram a associação entre o MAP e a DC, com base em relatos de detecção de anticorpos anti-MAP no soro, ou do bacilo em amostras de sangue e biópsias do cólon por PCR, RT-qPCR e técnicas de culturas em meio sólido/líquido, analisando 889 pacientes com DC. Concluíram que existe uma forte associação entre MAP e DC. A hipótese sobre o papel de MAP na etiologia da DC, ou a hipótese alternativa de que a doença de Crohn possa levar a uma maior suscetibilidade do paciente à infecção por MAP, o que por sua vez, contribui para a patogênese da DC, permanecem em aberto. No entanto, as tentativas de tratar pacientes com doença de Crohn com antibióticos antimicobacterianos (AMATanti-Mycobacterium Antibiotic Therapy) têm apresentado resultados inconclusivos; foi observada uma remissão mais rápida na maioria dos pacientes, porém instável (AGRAWAL *et al.*, 2020, PAVLI *et al.*, 2025)

Os dados apresentados indicam o possível potencial zoonótico da PTB em pacientes humanos portadores da doença de Crohn implicando assim em uma relevância na saúde pública, que ainda é desconhecida. Uma elucidação das questões referentes à epidemiologia e patogenicidade de MAP para seres humanos, é necessária a fim de estabelecer os riscos associados com PTB e MAP. A comprovação de que essa micobactéria causa a DC resultará numa drástica mudança nas indústrias pecuária e leiteira (ATREYA *et al.*, 2014; MCNEES *et al.*, 2015; SHOOR *et al.*, 2014). Dessa forma podemos enfatizar o controle da PTB, direcionado na redução da contaminação do leite e a transmissão do MAP para seres humanos como um desafio atual.

2.3 Diagnóstico da PTB: Métodos, Limitações e Desafios

Para diagnosticar a PTB são adotados diferentes métodos diagnósticos, sendo os principais: cultivo bacteriano, considerado padrão ouro; diagnóstico imunológico (detecção da imunidade celular através do teste intradérmico Derivado Proteico Purificado (PPD) ou teste de IFN- γ *in vitro*); sorologia (testes para detecção dos anticorpos contra MAP, como ELISA); diagnóstico molecular (detecção de DNA bacteriano por PCR nas fezes, tecidos ou leite) (NIELSEN; TOFT, 2008; SOUZA, 2015; YAMASAKI *et al.*, 2013).

O método mais conclusivo para diagnosticar a PTB é o isolamento bacteriológico do MAP das fezes ou tecidos dos animais, considerado o padrão-ouro (OIE, 2014), apesar de ter uma sensibilidade relativamente baixa, variando entre 50% e 70% (STABEL, 1997;

YAMASAKI *et al.*, 2013). Além da baixa sensibilidade, o método apresenta outras limitações. Um fator limitante é a dependência de MAP da micobactina, exigindo meios de cultura específicos, além do seu crescimento lento, que leva em torno de 16 semanas para o surgimento das primeiras colônias (CHIODINI *et al.*, 1984). A concentração detectável de bacilos nas fezes é alta, o que torna difícil a detecção dos animais nas etapas iniciais da doença, onde a eliminação do bacilo nas fezes é inexistente, em baixas concentrações ou intermitente (MANNING, 2001). Ao entrar na fase clínica da doença, apenas 15-25% dos animais podem ser diagnosticados por cultura bacteriana.

O teste sorológico comumente utilizado para identificar anticorpos contra o MAP está baseado no ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Embora essa abordagem seja relativamente simples de executar e economicamente acessível, sua especificidade está vinculada aos antígenos usados na captura de anticorpos, e assim como na cultura fecal a sensibilidade varia de acordo com a fase de infecção (BATES *et al.*, 2020). Bakker e colaboradores (2000) observaram que o teste de ELISA possui sensibilidade diretamente proporcional ao surgimento dos sinais clínicos, indo de 0% nas fases iniciais da doença até atingir 100% em animais na fase clínica da doença. Frequentemente, os resultados dos testes sorológicos são comparados com os resultados da cultura fecal, cuja sensibilidade em bovinos subclínicos permanecem incertas (SONAWANE; NARNAWARE; TRIPATHI, 2016). Entretanto, quando aplicados para confirmação do diagnóstico da PTB em vacas com sinais clínicos, os testes sorológicos demonstram um desempenho muito superior (OIE, 2014).

A prevalência da infecção por MAP de um rebanho é melhor determinada quando o ensaio de ELISA é empregado. Logo esse método diagnóstico é o mais utilizado nas triagens de rebanhos e nos programas de controle, analisando desde amostras de soro a amostras de leite (NIELSEN; TOFT, 2008; STABEL, 1997).

Um dos testes que se baseiam na análise da resposta imune celular contra o MAP é o teste intradérmico PPD *in vivo*, que se fundamenta na indução de uma ocorrência de hipersensibilidade tardia tipo (DTH) em resposta à injeção intradérmica do antígeno, obtida a partir de extratos proteicos purificados de MAP, conhecidos como PPD Johnina ou Paratuberculina (MANNING, 2001). Este teste é considerado positivo quando há um aumento da espessura da pele superior a 3 mm após 24 a 72 horas (NIELSEN *et al.*, 2002).

No entanto, suas desvantagens residem em alta incidência de resultados falso-positivos devido a reações cruzadas com micobactérias do ambiente. Como resultado, alguns especialistas desaconselham o uso do PPD no diagnóstico da PTB devido à baixa especificidade (capacidade de um teste diagnóstico dar como negativos indivíduos livres da doença) e à falha de correspondência com o estado de infecção do animal (CHIODINI *et al.*, 1984; COCITO *et al.*, 1994; RISTOW *et al.*, 2007).

Ainda sobre os testes baseados na imunidade celular, o IFN- γ é um ensaio de detecção da resposta mediada por células *in vitro*. Sua metodologia envolve estimular linfócitos bovinos isolados do sangue com vários antígenos microbianos, incluindo PPD Johnina e PPD *M. bovis*, para induzir a produção de IFN- γ , a quantificação do produto da resposta celular é feita por meio de ELISA (HUDA *et al.*, 2003). Este método é utilizado para detectar infecções recentes em bovinos jovens que ainda não apresentam anticorpos detectáveis, porém é pouco utilizado para diagnóstico da PTB, uma vez que há a necessidade de realizar a manutenção dos linfócitos *ex vivo*, o que faz com que o tempo de intervalo entre as coletas de amostras e os testes sejam longos. Além disso a interpretação dos resultados é dificultada devido à falta de consenso sobre os antígenos adequados para estimular os linfócitos (JUNGERSEN *et al.*, 2002).

Apesar das limitações, um estudo recente demonstrou que o ensaio de IFN- γ é uma ferramenta diagnóstica valiosa para a detecção de animais no estágio subclínico da doença. Garantindo à metodologia um papel valioso na gestão de bovinos expostos à MAP e na vigilância de bezerros mais jovens dentro de um rebanho. Além disso, o teste de IFN- γ pode ser usado como uma medida adicional para prevenir a introdução de animais infectados com MAP, especialmente em rebanhos onde a doença foi erradicada (CORNELI *et al.*, 2021).

Atualmente, testes baseados em PCR e qPCR são ferramentas importantes para detecção de MAP em animais com a infecção subclínica, em diversos materiais como leite, tecidos e fezes. Tais métodos surgiram após o avanço da biologia molecular que permitiu uma melhor caracterização do MAP e suas sequências de inserção específicas, sendo essas: IS900 e IS901, F57 (EL TIGANI-ASIL *et al.*, 2023). É uma técnica rápida diferentemente da cultura fecal.

Todavia, a ampla adoção dessa técnica enfrenta desafios significativos. Primeiramente, a obtenção de amostras de DNA de alta qualidade é frequentemente complicada, principalmente quando se trata de fezes de animais, que podem conter diversos inibidores de reação, como excesso de DNA irrelevante, polissacarídeos, sais biliares e outros elementos. Além disso, há a necessidade de equipamentos específicos, técnicos especializados e mão de obra treinada, elevando os custos, limitando sua aplicação, especialmente em países em desenvolvimento (GARRIDO *et al.*, 2000; WHITTINGTON *et al.*, 2019; YAMASAKI *et al.*, 2013).

No entanto, é importante destacar que, de forma geral, a maioria desses testes demonstra uma baixa sensibilidade (capacidade de um teste diagnóstico detectar como positivos, indivíduos doentes) em animais jovens ou nas fases iniciais do desenvolvimento da doença. Isso frequentemente resulta em falsos negativos nos resultados (MANNING, 2001; STABEL, 1997). Por outro lado, é mais comum a ocorrência de resultados falsos positivos quando se utilizam métodos imunológicos, como o sorodiagnóstico ou o teste PPD, devido a possíveis reações cruzadas com outras micobactérias que o gado pode adquirir do ambiente, induzindo respostas imunes (FACCIUOLO *et al.*, 2013; MANNING, 2001; RISTOW *et al.*, 2007). É interessante notar que a sensibilidade dos testes laboratoriais aumenta à medida que a doença progride, mesmo antes dos sinais clínicos se tornarem evidentes (GILARDONI *et al.*, 2016; STABEL, 1997).

Os principais desafios no diagnóstico da PTB estão relacionados ao longo período de incubação e ao caráter crônico da infecção. Os sinais clínicos são tardios uma vez que o sistema imune exerce controle sobre a infecção durante períodos prolongados de tempo. Tais características da resposta imunológica do hospedeiro dificultam a detecção precoce do agente etiológico, MAP, em animais (NIELSEN; TOFT, 2008; SOUZA, 2015).

2.4 Infecção por MAP e Biomarcadores Fecais (APA)

A PTB leva a uma infecção que desencadeia um processo inflamatório que pode ser classificado como crônico granulomatoso, afetando o trato gastrointestinal de ruminantes domésticos e selvagens. MAP possui rota de transmissão horizontal, pela via oral-fecal, por meio de água, solo e alimentos contaminados (BUITRAGO-LÓPEZ *et al.*, 2021; MALLIKARJUNAPPA *et al.*, 2020; WHITTINGTON *et al.*, 2012).

Após a ingestão, MAP chega ao intestino onde células M (*microfolds cells*), que se localizam no epitélio associado aos folículos da placa de Peyer e folículos linfoides isolados (ILFs), fagocitam o patógeno. Posteriormente, os bacilos entram em contato com células dendríticas (DC) e macrófagos na região subepitelial da lâmina própria (GULLIVER *et al.*, 2015; MOWAT; AGACE, 2014; YAMASAKI *et al.*, 2013). Ao adentrar os macrófagos, MAP inicia ciclos da sua reprodução, e as DC infectadas migram para os linfonodos intestinais e desempenham sua função como células apresentadoras de antígenos, induzindo assim a resposta imune adaptativa, ativando os linfócitos.

Ativados os linfócitos T e B, monócitos e neutrófilos são recrutados ao local da infecção dando origem aos granulomas destinados a contenção micobacteriana. Assim, o sistema imune controla a infecção (Figura 1) através da inibição da multiplicação da bactéria, o que corresponde a uma longa fase subclínica, que pode durar de 2 a 5 anos, sem eliminação do microrganismo nas fezes ou com eliminação intermitente (BUITRAGO-LÓPEZ *et al.*, 2021; CHIODINI *et al.*, 1984; GULLIVER *et al.*, 2015). Em ruminantes, a região-alvo da patologia é a junção ileocecal e jejuno. O período subclínico é inversamente proporcional a dose de infecção, que pode ser paubacilar (baixa carga bacteriana) e multibacilar (alta carga bacteriana). (GULLIVER *et al.*, 2015; LOMBARD, 2011).

A intensidade da resposta inflamatória granulomatosa induzida por MAP na mucosa intestinal, promove o espessamento da parede intestinal do animal, o que acarreta a diminuição da capacidade de absorção do intestino e enteropatia com perda de proteínas, levando, assim aos sinais clínicos característicos da patologia, que são: diarreia intermitente persistente, perda de peso progressiva e eventual morte (BUITRAGO-LÓPEZ *et al.*, 2021; CHIODINI *et al.*, 1984). Dessa maneira, de acordo com a severidade dos sinais clínicos, a doença apresenta quatro estágios de evolução descritos. O primeiro estágio é denominado fase

silenciosa, onde os animais não apresentam nenhum sinal clínico e não é possível detectar MAP com técnicas diagnósticas como o cultivo e PCR das fezes; o segundo é quando MAP pode ser excretado ativamente nas fezes, embora os sinais clínicos da doença não sejam identificados pelos métodos diagnósticos. O rebanho pode permanecer nestes estágios sem desenvolver a doença clínica ou pode progredir para o estágio clínico, tipicamente após dois anos de infecção. O terceiro estágio se caracteriza pelo período em que o animal apresenta sinais clínicos que evidenciam a doença, como diarreia e perda de peso e o quarto e último estágio é caracterizado pelos sinais avançados da doença incluindo emagrecimento, letargia e diarreia profusa, podendo levar o animal a morte por desidratação (BUITRAGO-LÓPEZ *et al.*, 2021; FECTEAU, 2018).

Uma observação importante é que nem todos os animais infectados irão apresentar sinais clínicos durante sua vida produtiva. Esta é uma das dificuldades enfrentadas no controle da doença, os animais eliminam MAP frequentemente nas fezes antes de demonstrar quaisquer sinais clínicos, promovendo assim a disseminação da doença (LOMBARD, 2011).

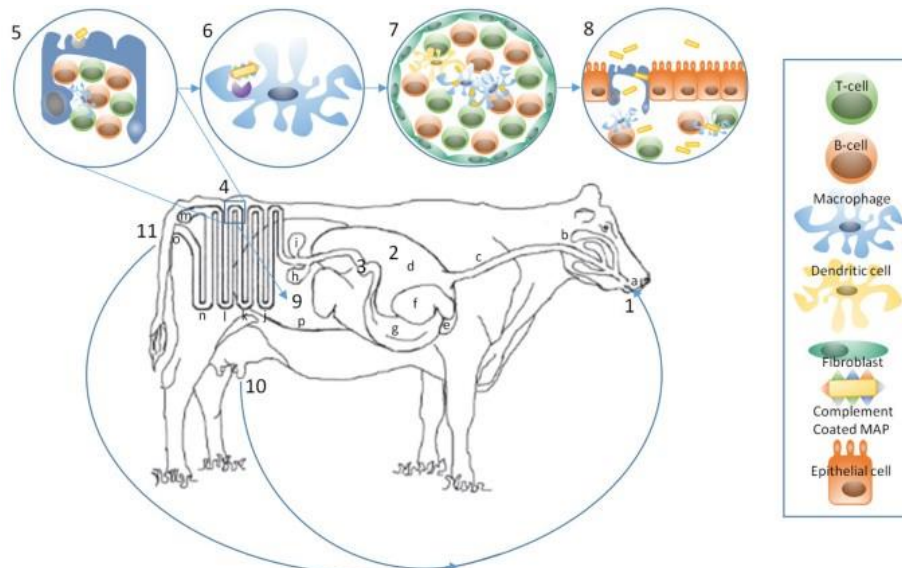


Figura 1. Infecção por MAP via oral. O MAP é ingerida (1) e percorre o trato gastrointestinal, sendo potencialmente captada pelas criptas tonsilares e transportado para o íleo. No rúmen (2), ocorre a ativação da resposta imunológica da bactéria, que é opsonizada pela fibronectina ao adentrar o trato digestivo inferior (3). Após atingir o íleo (4) MAP é fagocitada pelas células M presentes nas placas de Peyer, reconhecendo a bactéria por meio do receptor de fibronectina (5), migrando através do epitélio até os macrófagos intraepiteliais. Estes macrófagos captam MAP revestida pelo complemento, por meio dos receptores do complemento (6), formando granulomas (7) que abrigam infecções latentes por MAP. Durante a Doença de Johne ativa (8), MAP pode ser

transmitido ao feto (5), aos neonatos durante a amamentação, resultante da preparação nas glândulas mamárias e no leite, o que aumenta a virulência (9). Alternativamente, a transmissão pode ocorrer através da matéria fecal que contamina o ambiente (10). (a) Boca (b) Glândulas salivares (c) Esôfago (d) Rúmen (e) Reticulo (f) Omaso (g) Abomaso (h) Vesícula biliar (i) Pâncreas (j) Duodeno (k) Jejuno (l) Íleo (m) Ceco (n) Intestino Grosso (o) Ânus (p) Útero.

Durante a infecção por MAP, diversos antígenos micobacterianos são expressos e secretados ao longo do processo infeccioso, desempenhando papel central tanto na interação patógeno–hospedeiro quanto na indução da resposta imune. Antígenos secretados ou liberados para o meio extracelular apresentam especial relevância diagnóstica, uma vez que podem ser detectados diretamente em amostras biológicas, independentemente da viabilidade bacteriana, o que os torna alvos estratégicos para métodos imunológicos (STABEL, 2002).

Nesse contexto, a proteína APA, é descrita como uma glicoproteína imunogênica, amplamente conservada entre micobactérias, mas com regiões que permitem sua aplicação no diagnóstico da PTB. Estudos prévios demonstraram sua presença em tecidos infectados e sua forte reatividade com anticorpos de animais naturalmente infectados, indicando seu papel relevante na resposta humoral associada à PTB (GIOFFRÉ *et. al*, 2009; SOUZA *et. al*, 2011)

Souza e colaboradores (2018) demonstraram, pela primeira vez, a detecção da proteína APA em amostras fecais de bovinos infectados, estabelecendo-a como um biomarcador fecal específico para a PTB. Esse achado representou um avanço importante no diagnóstico da doença, uma vez que a eliminação fecal do MAP ocorre de forma intermitente no início da infecção e frequentemente antecede o aparecimento de sinais clínicos e a soroconversão. Assim, a detecção de antígenos secretados, como a APA, em fezes, permite a identificação de animais bacilíferos em fases clínica e subclínica da infecção, superando limitações observadas em métodos sorológicos convencionais.

Com base nessas informações Souza e colaboradores (2011), produziram anticorpos anti-APA contra a sua forma recombinante e os utilizaram na imunodetecção espécie-específica do MAP no tecido intestinal de bovinos com paratuberculose. A partir dessa pesquisa, o grupo desenvolveu o kit ELISA PTB-Detect e o modelo de teste rápido PTB-RAPID, tendo como alvo a detecção do antígeno em fezes de bovinos, oferecendo assim uma

alternativa nacional, acessível e simples, aos testes moleculares convencionais para o diagnóstico da PTB, cujos kits precisam ser importados.

2.5 Ensaios de Fluxo Lateral (Imunocromatografia)

Uma ampla gama de testes de diagnóstico rápido baseados em princípios de imunocromatografia para diversos fins estão disponíveis no mercado. No atual contexto, existem testes disponíveis para monitorar a ovulação, detecção de agentes infecciosos e medição de diversos analitos importantes para a fisiologia humana e animal. Alguns destes produtos são testes rápidos voltados também para a área veterinária, como para o diagnóstico de doenças como a brucelose, tuberculose e leucemia bovina, entre outras doenças (BARSHEVSKAYA *et al.*, 2019; RIDLEY, 2006).

Os testes imunocromatográficos, como os ensaios de fluxo lateral, baseiam-se na interação antígeno-anticorpo em uma membrana de nitrocelulose para a detecção de patógenos ou biomoléculas. Esses ensaios são amplamente aplicados em diagnósticos rápidos, devido ao seu baixo custo e simplicidade, permitindo sua utilização diretamente no local de atendimento (PoC). Além de não exigirem equipamentos sofisticados para execução ou interpretação dos resultados, apresentam alta sensibilidade e especificidade, características essenciais para seu sucesso (HOLLAND; KIECHLE, 2005; KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

No campo veterinário, esses testes também são amplamente empregados para a detecção de diversos patógenos em animais, como o vírus da cinomose canina, parvovírus, leishmania e giárdia. Além de serem economicamente acessíveis, esses testes são portáteis, o que os torna ideais para uso em campo, fazendas ou clínicas móveis, facilitando diagnósticos rápidos e precoces, o que é fundamental para o tratamento eficaz de doenças. O tempo médio para obtenção de resultados desses testes é de aproximadamente 15 minutos após a aplicação de amostras, que podem ser urina, fezes, sangue total, soro, saliva ou outros fluidos corporais, dependendo das implicações clínicas do teste (TINKY *et al.*, 2015).

Esses testes em geral seguem um formato que inclui uma membrana de nitrocelulose para a detecção, um filtro para amostras ("*Sample Pad*") composto por fibras de algodão ou celulose, e uma microfibras de vidro contendo o reagente cromógeno ("*Conjugate Pad*"). As

nanopartículas de ouro coloidal são frequentemente utilizadas como reagente cromógeno devido à sua estabilidade superior em comparação com reagentes fluorescentes ou enzimáticos. O teste também inclui uma zona de absorção ("*Absorbent Pad*"), uma linha teste ("*Test Line*"), onde o reagente de detecção (antígeno ou anticorpo) é impregnado, e uma linha controle ("*Control Line*"), que serve como verificação do reagente. Todo o sistema é montado em um cassete plástico ("*Housing*"), que possui um receptáculo circular para aplicação da amostra e uma janela quadrada posicionada sobre a área de detecção (Figura 2).

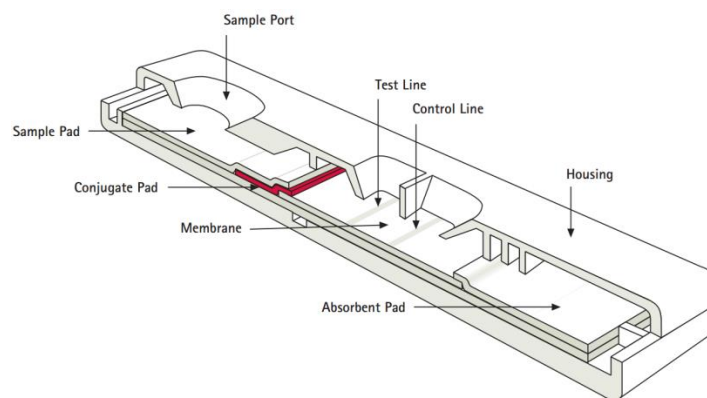


Figura 1. Esquematização estrutural de um teste imunocromatográfico (fluxo lateral).
Fonte: CD Bioparticles.

2.6 Desenvolvimento de testes rápidos

No desenvolvimento de um teste rápido, o processo comumente se inicia com a identificação biomarcadores diagnósticos, como antígenos ou anticorpos específicos com imunogenicidade comprovada. Em seguida, são selecionados e estabelecidos os componentes e reagentes necessários para o teste e, então, se inicia a criação de um protótipo. Esse protótipo é testado e refinado até que o teste esteja pronto para ser implementado na rotina clínica (Figura 3) (KETTLER; WHITE; HAWKES, 2004).



Figura 2. Fluxograma do desenvolvimento e avaliação de testes imunocromatográficos rápidos.
Adaptado de Kettler et al. 2004.

O fluxo para o desenvolvimento de testes rápidos inclui inicialmente os estudos de "prova do princípio", que visam comprovar a viabilidade do teste diagnóstico para a detecção do alvo desejado. Em seguida, o protótipo passa pelo processo de validação, sendo testado com amostras conhecidas, denominadas "de conveniência", nas quais são avaliados os parâmetros de sensibilidade, especificidade e valores preditivos. Após essa etapa, o protótipo é avaliado diretamente na população-alvo. Os resultados desses estudos são então reunidos e utilizados para obter a aprovação dos órgãos reguladores, permitindo a comercialização do produto. Após aprovação e lançamento no mercado, podem ser realizados estudos de aplicabilidade e implementação, com o objetivo de demonstrar a relação custo-efetividade do teste (OMS e TDR, 2010).

3 JUSTIFICATIVA

A PTB é uma enfermidade infecciosa crônica de grande impacto sanitário e econômico na pecuária, uma vez que compromete a produtividade dos rebanhos, aumenta os custos com manejo e descarte de animais e dificulta o controle sanitário nas propriedades. O diagnóstico da PTB é particularmente desafiador devido ao longo período de incubação da doença, à eliminação intermitente de MAP nas fezes e à baixa sensibilidade de métodos diagnósticos isolados, especialmente nas fases iniciais da infecção. Dessa forma, o diagnóstico confiável da PTB geralmente requer a combinação de diferentes abordagens laboratoriais, clínicas e epidemiológicas.

Atualmente, os testes moleculares baseados na detecção do DNA micobacteriano em amostras fecais, como a RT-PCR, são considerados métodos confirmatórios para o diagnóstico da PTB. Apesar de sua elevada sensibilidade e especificidade, esses ensaios apresentam limitações importantes, incluindo alto custo, dependência de equipamentos laboratoriais sofisticados, necessidade de mão de obra altamente especializada e, no contexto brasileiro, forte dependência de kits importados. Essas limitações dificultam a aplicação rotineira desses métodos em programas de vigilância sanitária, especialmente em propriedades rurais localizadas em regiões afastadas dos grandes centros de diagnóstico.

No Brasil, a disponibilidade de métodos de diagnóstico para a PTB é insuficiente, principalmente em relação ao custo, dificuldade de importação dos testes, tempo de resposta e sensibilidade. A maioria dos casos ainda é identificada com base em observações anátomo-histopatológicas nos abatedouros. A confirmação deve ser realizada através de testes laboratoriais específicos, como culturas e ensaios de ELISA ou molecular, que dependem dos kits diagnósticos importados, de custo elevado e de mão de obra especializada (CHIODINI *et al.*, 1984). Evidenciando assim a necessidade do desenvolvimento de novos métodos diagnósticos da PTB nacionais com maior sensibilidade, especificidade e baixo custo que favoreça o rastreamento da doença em rebanhos.

Como alternativa, testes imunológicos voltados para a detecção direta de antígenos micobacterianos em fezes vêm ganhando destaque por apresentarem menor custo, maior simplicidade operacional e potencial para aplicação em larga escala. Nesse contexto, o Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) desenvolveu o kit ELISA PTB-Detect,

baseado na detecção fecal de antígenos de MAP, representando uma estratégia promissora para complementar os testes moleculares no diagnóstico da PTB. A validação desse ensaio é essencial para consolidar sua aplicabilidade diagnóstica e seu potencial de incorporação em programas de controle da doença.

Entretanto, mesmo os testes ELISA ainda demandam infraestrutura laboratorial básica e não permitem a tomada de decisão imediata no campo. Considerando a necessidade crescente de identificar rapidamente animais infectados, especialmente aqueles que eliminam grandes quantidades de MAP nas fezes (animais bacilíferos e altamente infecciosos), torna-se evidente a demanda por métodos diagnósticos ainda mais rápidos, simples e acessíveis.

Nesse cenário, os testes, como os ensaios imunocromatográficos de fluxo lateral, surgem como uma ferramenta estratégica para o controle da PTB, pois permitem o diagnóstico direto na propriedade rural, sem necessidade de equipamentos, com resultados obtidos em poucos minutos.

O desenvolvimento de um teste imunocromatográfico fecal baseado na detecção do antígeno APA de MAP representa uma abordagem inovadora e alinhada às necessidades reais do campo. Esses testes são naturalmente de baixo custo, fáceis de operar e fornecem resultados rápidos, possibilitando que médicos-veterinários e produtores identifiquem animais infectados em aproximadamente 15 minutos. Essa agilidade favorece a adoção imediata de medidas sanitárias, como isolamento, descarte seletivo e fortalecimento de protocolos de quarentena para a introdução de novos animais no rebanho.

Além do impacto diagnóstico, o presente trabalho também se justifica pelo seu caráter translacional e extensionista, ao integrar o desenvolvimento tecnológico de insumos diagnósticos com ações de capacitação e educação sanitária junto a produtores rurais e profissionais da área. Dessa forma, o estudo contribui não apenas para o avanço científico e tecnológico no diagnóstico da PTB, mas também para a disseminação de boas práticas de manejo, fortalecimento da vigilância sanitária regional e redução dos impactos econômicos e sanitários da doença na pecuária.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar testes imunquímicos para o diagnóstico da paratuberculose bovina em amostras fecais, incluindo a validação do kit ELISA PTB-Detect e o desenvolvimento de um modelo de teste imunocromatográfico de fluxo lateral baseado na detecção do antígeno APA do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

4.2 Objetivos Específicos

- 1) Coletar material biológico (fezes e sangue) de animais dos rebanhos bovinos com histórico de PTB em diferentes fazendas das regiões Norte e Noroeste Fluminense;
- 2) Produzir e purificar dos anticorpos monoclonais e policlonais anti-APA-MAP;
- 3) Realizar rastreio dos animais nos rebanhos com histórico de PTB através de avaliação clínica e sorodiagnóstico, utilizando um *kit* ELISA comercial para identificação dos animais soropositivos;
- 4) Processar amostras de fezes dos animais soropositivos e soronegativos e submeter ao diagnóstico fecal, utilizando um kit de Real-Time PCR comercial e o novo kit ELISA PTB-Detect;
- 5) Testar os anticorpos monoclonais e policlonais anti-APA quanto ao seu potencial funcional em testes imunocromatográficos, utilizando um kit comercial (*Universal Lateral Flow Assay Kit – ab270537*);
- 6) Desenvolver um modelo do teste imunocromatográfico de fluxo lateral, visando estabelecer um protótipo;
- 7) Iniciar a produção de insumos para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico de fluxo lateral;
- 8) Integrar ações extensionistas com produtores rurais e médicos-veterinários da região, promovendo educação sanitária, capacitação técnica e disseminação de boas práticas de manejo e diagnóstico da PTB.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta de material biológico do gado com PTB

Foram obtidas amostras de fezes diretamente da ampola retal, enquanto o sangue foi coletado por punção da veia coccígea, com a assistência dos veterinários da equipe. Ambas as amostras foram devidamente identificadas, acondicionadas em recipientes plásticos com tampa, refrigeradas e transportadas para o Laboratório LBR da Universidade Estadual do UENF. As coletas foram realizadas nas regiões Norte e Noroeste Fluminense, Macaé e Região dos Lagos. O sangue coletado foi submetido a centrifugação a uma velocidade de 760 x g, a uma temperatura de 4 °C, durante um período de 10 minutos. Os soros resultantes foram devidamente armazenados a -20 °C, para análises posteriores. Quanto às amostras fecais, estas foram preservadas a -70 °C para armazenamento adequado. Simultaneamente as coletas de fezes, foram realizadas ações extensionistas juntamente com os produtores de leite e veterinários das regiões. Tais ações, incluíram distribuição de folders informativos sobre a PTB e os risco de ter a doença no rebanho.

5.2 Descongelamento e cultivo dos hibridomas anti-APA-MAP

As células de hibridomas 6F/9 foram descongeladas da seguinte maneira: um criotubo, com as células foi retirado do tanque de nitrogênio líquido e colocado em água para um banho termoestático a 37 °C. Após rápido descongelamento, seu conteúdo foi transferido para um tubo cônico (*Corning*, EUA) de 15 mL, contendo 9 mL de meio nutricional *Dulbecco's Modified Eagles Medium* F-12 (DMEM-F12, GIBCO, BRL), e submetido à centrifugação a 1150g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi ressuspendido em 5 mL de meio nutricional (DMEM-F12, GIBCO, BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino, (SFB, GIBCO, BRL, EUA), 10µg/mL de antibiótico gentamicina e 0,5 mM de 2-β mercaptoetanol. As células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂, com troca de meio a cada três dias. Para produção dos anticorpos monoclonais (mAb), as células de hibridoma foram cultivadas em frascos para cultura celular de 75 cm² por 10 dias, e o sobrenadante de cultura foi coletado pela centrifugação e submetido ao isolamento de anticorpos utilizando o protocolo de 2-etapas (tratamento com ácido caprílico e sulfato de amônio). O sobrenadante foi mantido a 4 °C e centrifugado a 10.000 x g por 20–30 minutos a 4°C para remover células e detritos. Os anticorpos foram purificados do sobrenadante obtido por meio da precipitação de albumina e outras proteínas do SFB com ácido caprílico. O

sobrenadante foi diluído com tampão Acetato de Sódio 60 mM (pH 4,0) em uma proporção de 1:2. O pH foi ajustado para 4,5 com ácido acético 0,1M, adicionado gota a gota, até uma concentração final de 25–33 μ L por mL do sobrenadante original. Após agitação por 30 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi centrifugado por 30 minutos a 10.000 x g/14000 rpm. O sobrenadante contendo as imunoglobulinas foi coletado e submetido à precipitação com sulfato de amônio para concentrar o mAb purificado e remover o ácido caprílico residual. O pH do sobrenadante foi ajustado para 7,2 usando Tris-HCl 1 M (pH 8,0). Foi adicionado Sulfato de Amônio Saturado (SAS) (1 mL de SAS para cada 1 mL de sobrenadante neutralizado), gota a gota, sob agitação no gelo, até atingir 50% de saturação final. Após incubação por 4 horas a 4°C, o precipitado foi obtido pela centrifugação a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi dissolvido em um volume de 5% do volume original de PBS (pH 7.4). Foi realizada dessalinização por meio de diálise contra PBS a 4°C durante a noite para remover o excesso de sal.

5.3 Produção do líquido ascítico

Para produzir anticorpos monoclonais no líquido ascítico em camundongos, foi feita a injeção intraperitoneal de 0,5ml de *Pristane* (Sigma Chemical Co EUA) nos camundongos Balb/c. Após 7 dias os camundongos receberam, por via intraperitoneal, 2×10^6 células do hibridoma para induzir ascite como resultado do processo carcinogênico. A coleta do líquido ascítico foi realizada aproximadamente no 10º dia após a injeção das células. O líquido foi submetido a centrifugação a 1000g por 5 min e os respectivos sobrenadantes foram armazenados a -20°C. Todos os protocolos de pesquisa com camundongos foram aprovados pela CEUA da UENF (certificado número 544).

Purificação do líquido ascítico foi feita por ácido caprílico. Sucintamente, o líquido ascítico foi diluído duas vezes em tampão Acetato de Sódio 60mM pH 4,0, com posterior ajuste do pH do soro para 4,5. Foram adicionados 25 μ L, gota a gota, de ácido caprílico para cada mL de solução sob constante agitação. Após 30 min, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 x g, e os sobrenadantes foram dialisados *overnight* contra PBS 1X. As amostras foram estocadas a -20 °C até o uso. Para confirmar o grau de pureza das amostras de IgG purificadas do líquido ascítico, foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, corado com azul de *Coomassie* (Makkay *et al.*, 1999).

5.4 Descongelamento e processamento de amostras de imunoglobulinas IgY anti-APA produzidas anteriormente

As gemas de ovos passaram por processamento prévio para o isolamento dos anticorpos por protocolo de tratamento com sulfato de amônio. Os anticorpos IgY anti-APA obtidos foram armazenados a -20°C . A partir desse estoque, os anticorpos anti-APA foram descongelados e o precipitado obtido por meio da centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 min a 4°C . O pellet foi dissolvido em um volume de 5% do volume original de PBS (pH 7.4). Foi realizada dessalinização por meio de diálise contra PBS 1X a 4°C *overnight* para remover o excesso de sal.

5.5 Dosagem de proteínas pela construção da curva padrão BSA (Albumina Sérica Bovina)

O conteúdo protéico da solução contendo IgY purificada foi determinado pelo método do ácido bicinconínico (BCA - adaptado de Lowry, 1959), utilizando BSA (Bovine Serum Albumin) para gerar a curva padrão de análise, segundo metodologia indicada pelo fabricante (Sigma-Aldrich).

5.6 Eletroforese SDS-PAGE

As amostras de sobrenadante de cultura de MAP ($5\mu\text{l}/\text{canaleta}$), *M. avium avium* ($5\mu\text{l}/\text{canaleta}$), M299 (isolado clínico de *M. tuberculosis*) ($5\mu\text{l}/\text{canaleta}$), bem como os anticorpos Anti-APA MAP monoclonal IgG ($2,10,20\mu\text{g}/\text{canaleta}$) e policlonal IgY ($2,5,10\mu\text{g}/\text{canaleta}$); foram submetidas a desnaturação em tampão de amostra 4X (60 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 5% 2- β -mercaptoetanol, 10% de glicerol, 0,025% azul de bromofenol), fervidas por 5 minutos e analisadas por eletroforese em SDS-PAGE a 12% e 15% utilizando protocolos convencionais. 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 massa moleculares conhecidas. Posteriormente ao protocolo convencional SDS-PAGE, para a visualização das proteínas após eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Blue (1% coomassie brilliant blue R-250; 10% ácido acético, 50% metanol) por 1h. O excesso de corante foi removido com ácido acético 10% em água.

5.7 Western Blotting

Posteriormente 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, a membrana foi bloqueada com PBST 0,05% (*Phosphate-buffered saline*+*Tween* 20%) com 5% de leite desnatado por 18h a 4°C. Após esse processo a membrana passou por processo de lavagem com PBS1X. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo primário monoclonal IgG anti-rAPA MAP (100:10000); policlonal IgY anti-rAPA MAP (1:100); durante 1h sob agitação mecânica. Após esse período a membrana foi lavada com PBST 0,05% por 5 vezes sob agitação mecânica durante 5min. Foi adicionado o anticorpo secundário policlonal anti-mouse IgG (1:2000) (Biolegend®) ou *goat anti-chicken IgY- HRP* (diluído 1:2000) (Calbiochem-Novabiochem Corp.) e incubado durante 1h sob agitação mecânica. As membranas foram lavadas nas mesmas condições acima citadas. A revelação da membrana foi realizada com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB (diaminobenzidina) (100µl Tris-HCL 2M ph 7,5 + 4,9 ml de água destilada + 5mg DAB + 0,3ml imidazol 0,1M + 5µl H₂O₂).

5.8 Sorodiagnóstico

A análise da presença de anticorpos anti-MAP foi conduzida por meio do ensaio de ELISA, utilizando o kit comercial PARAS-4P ID-Vet Screen® Paratuberculosis Indirect Screening test da França, conforme as instruções do fabricante. O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços que previamente foram sensibilizadas com o antígeno do MAP. Para a leitura das placas, um espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm (OD450) foi empregado. A interpretação dos resultados baseou-se na razão amostra/controlado positivo (S/P), calculada da seguinte maneira: $S/P = 100 \times (\text{valor da OD450 da amostra} -$

valor da OD450 do controle negativo) / (valor da OD450 do controle positivo – valor da OD450 do controle negativo). O ponto de corte adotado para amostras negativas em relação aos anticorpos anti-MAP foi estabelecido em valores S/P iguais ou inferiores a 60%. Para amostras consideradas suspeitas, o ponto de corte situou-se entre 60% e 70%. Resultados iguais ou superiores a 70% foram classificados como positivos, de acordo com as orientações do fabricante.

5.9 Processamento de amostras de animais soropositivos e soronegativos

Todas as amostras de fezes coletadas foram submetidas ao processamento desenvolvido no LBR. Cerca de 1g de fezes foi diluído em 6 ml de PBST 0.05%. As amostras foram homogeneizadas sob agitação mecânica em vórtex durante 3 min cada amostra. As suspensões fecais foram centrifugadas a 2000x g durante 10 min a 4°C. Uma porção do sobrenadante (2 ml) foi transferida para um tubo de microcentrífuga estéril e utilizado para testes ou armazenado a -20°C.

5.10 Imunodeteção de antígeno APA em sobrenadante fecal através de ELISA sanduíche (método proposto)

A placa de 96 poços de ELISA foi sensibilizada com 100µl/poço do anticorpo de captura - MAb anti-APA MAP (2µg/ml) em presença do tampão de carbonato-bicarbonato (Na₂CO₃ 0,015M + NaHCO₃ 0,035M) por 18h a 4°C. Em seguida, o anticorpo foi descartado, a placa foi lavada em PBST 0,05% e bloqueada através de incubação com solução de bloqueio (PBST com SFB 10%) por 1h a 37°C para evitar ligações inespecíficas. Após esta etapa, a placa foi lavada 1 vez com PBS1X, incubada com 100µl/poço do sobrenadante fecal e incubada em estufa a 37°C por 1h. Logo após, a placa foi submetida a uma dupla lavagem com PBST 0,05% e, posteriormente, foi incubada por 1 h a 37°C com 10µL/poço do anticorpo de detecção IgY anti-APA MAP diluído em PBST com 0,5% gelatina. Posteriormente, a placa foi lavada quatro vezes com PBST e incubada com o anticorpo secundário, *goat anti- chicken IgY- HRP* (diluído 1:10000) (Calbiochem-Novabiochem Corp.) por 1 h em estufa sob a temperatura de 37°C. A reação foi interrompida adicionando-se 60µl de H₂SO₄ 3N por poço e revelada com 60µl da solução OPD (o-fenilenodiamina – 2HCl, ácido cítrico 20mM, fosfato de sódio 40mM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro

visível - Epoch a 492 nm. Como controle negativo, foi utilizado um animal soronegativo proveniente de uma fazenda que não possui histórico de PTB.

5.11 Extração de DNA de *M. avium paratuberculosis* em amostras fecais

As amostras de fezes coletadas foram submetidas a extração de DNA utilizando um kit comercial, Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep kit (Zymo) de acordo com o procedimento do fabricante. Resumidamente, ao *ZR Bashing Bead Lysis Tube* foram adicionados 150mg de fezes e 750µl de Bashing Bead Buffer, levados para agitação mecânica em vórtex com suporte para tubo de microcentrífuga durante 40min. Em seguida esses tubos foram submetidos a centrifugação a 10000X g por 1min; 400µl do sobrenadante foram transferidos para um *Zymo-spin III-Filter* conectado a um tubo de coleta que foi conduzido a centrifugação a 8000Xg por 1min. Descartou-se o filtro e ao tubo de coleta foram adicionados 1200µl do *Genomic Lysis Buffer* e passou por homogeneização. Foram transferidos 800µl da mistura para uma coluna *Zymo Spin IICR* conectada a um tubo de coleta e levado a centrifugação por 1min a 10000X g a etapa foi repetida com os outros 800µl restantes no primeiro tubo de coleta. Após esse processo o filtrado resultante foi descartado e a coluna *Zymo Spin IICR* conectada a um novo tubo de coleta e adicionados 200µl de *DNA Pre-Wash Buffer* e levado a centrífuga por 1min a 10000X g. Ao mesmo filtro foram adicionados 500µl de *g-DNA Wash Buffer* e submetido as mesmas condições de centrifugação. A coluna então foi acoplada a um tubo de microcentrífuga de 1,5ml e adicionados 100µl do tampão *DNA Elution* diretamente a matriz da coluna e submetido ao processo de centrifugação por 30s a 10000X g. O DNA eluído foi transferido para o *Zymo Spin III-HCR* (previamente preparado) e conectado ao um tubo de microcentrífuga de 1,5ml e submetido a centrifugação exatamente nas seguintes condições 16000X g por 3min. As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -20°C para quantificação e amplificação pela qPCR.

5.12 Detecção de DNA em amostras fecais por PCR em tempo real (VetMAX™ MAP Real-Time PCR)

As amostras de DNA extraídas das amostras fecais previamente, foram submetidas ao protocolo do kit VetMAX™ MAP Real-Time PCR (Life Technologies). Foi preparada a reação de PCR (Mix) seguindo recomendação do fabricante onde foram adicionados 12,5µl de 2xqPCR Master Mix; 1,0µl da mistura de sonda primer MAP 25x; 3,5µl de água sem

nuclease totalizando 17µl por reação. Por fim foram adicionadas 4,0µl de DNA-Fezes (amostras); 8,0µl de água livre de nuclease (controle negativo do kit); 8,0µl do mix DNA MAP-Xeno (controle positivo do kit); 8,0µl de PBS purificado (controle de extração). A placa então foi selada e submetida a centrifugação breve e em seguida levada ao StepOne™ Real-Time PCR System configurado de acordo com as instruções do kit.

5.13. Testagem dos anticorpos monoclonal IgG anti-APA MAP e policlonal IgY anti-APA MAP quanto a seu potencial funcional em kit imunocromatográfico (*Univeral Lateral Flow Assay Kit – ab270537*)

Os anticorpos monoclonais anti-APA MAP e policlonal IgY anti-APA MAP foram testados como anticorpo de detecção e captura, respectivamente, seguindo o protocolo do kit *Univeral Lateral Flow Assay – ab270537*. O anticorpo policlonal IgY anti-APA MAP foi utilizado como anticorpo de captura e conjugado com o Lightning-Link® Ulfa-Tag. O anticorpo de captura foi diluído para se obter a concentração de 1mg/ml. Em seguida 100µl da diluição para um novo tubo de microcentrífuga e adicionado 1µl de LL-Modifier para cada 10µl de anticorpo. A mistura foi adicionada ao frasco Ulfa-Tag diretamente no material liofilizado ressuspendendo uma ou duas vezes. O frasco contendo a mistura foi incubado por 18h a 4°C. Após esse período foram adicionados 10µl de LL-Quencher e incubado por 30min em temperatura ambiente. O anticorpo de detecção monoclonal anti-APA MAP foi então diluído até se obter a concentração de 1mg/ml. Ao anticorpo diluído foram acrescentados 42µl do tampão de reação Gold. Dessa mistura 45µl foram transferidos para um *minivial* do kit com 1µg de ouro e incubado por 15min em temperatura ambiente. Após esse período adicionou-se 5µl de Gold Quencher ao *minivial* e foi homogeneizado cuidadosamente incubando por 15min em temperatura ambiente. Seguiu-se então o preparo do tampão universal de corrida em 1:10 com água destilada e 0,1% de BSA que funciona como agente bloqueador. Em seguida os anticorpos de captura (40 a 150µg/ml) e detecção (6OD) foram diluídos no tampão universal de corrida bloqueado com 0,1% BSA. Também foram diluídos no tampão universal de corrida 0,1% BSA a Gold-Biotin (10OD) e o sobrenadante fecal (100µl de amostra+ 50µl do tampão universal de corrida 0,1% BSA). Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 5µl do anticorpo de captura IgY anti-APA MAP conjugado com Ulfa-Tag; 5µl do anticorpo de detecção anti-APA MAP conjugado com ouro; 5µl do controle de Gold-Biotin (10OD); e 75µl de sobrenadante fecal. Em placa de 96 poços

foram adicionados 80µl da mistura em cada poço e inserida uma fita (LFA- Lateraly Flow Assay), seguido de incubação por 20min. Após esse período a linha teste será marcada em vermelho e abaixo desta, a linha diagnóstica.

5.14 Idealização do protótipo da plataforma diagnóstica imunocromatográfica

A partir de estudos iniciais, o protótipo para o teste imunocromatográfico PTB fecal RAPID baseia-se na detecção do antígeno Apa presente em amostras de fezes de animais com PTB. No modelo proposto, a amostra contendo o antígeno é aplicada na extremidade de uma fita de nitrocelulose, permitindo que ela percorra o dispositivo por capilaridade. Um conjugado de anticorpos IgY anti-Apa policlonal biotinizados reage com o antígeno na área de aplicação (*sample pad* – SP). Ao seguir o fluxo o conjugado passa pelo *conjugated pad* (CP) onde como anticorpos de detecção estão acoplados o conjugado IgG murina anti-APA monoclonal ligado a ouro coloidal (20nm, 1OD). Ao migrar, o complexo imune é capturado na linha de teste (T), onde moléculas de estreptavidina imobilizadas reconhecem a biotina, originando uma banda colorida. A linha controle (C) composta por anticorpos anti-IgG murino, captura os anticorpos monoclonais conjugados a ouro remanescentes, validando o fluxo e confirmando a funcionalidade da plataforma. O resultado positivo é visualizado pela presença simultânea das linhas T e C, enquanto o negativo se caracteriza pela presença exclusiva da linha C. O modelo imunocromatográfico idealizado segue em desenvolvimento e testagem.

5.15 Produção de insumos para teste rápido

A produção de insumos destinados ao desenvolvimento do teste rápido imunocromatográfico de fluxo lateral para detecção do antígeno APA foi realizada com o objetivo de viabilizar a montagem de um protótipo funcional, compatível com a análise de amostras fecais bovina. As etapas metodológicas envolveram a modificação química dos anticorpos por biotinilação, bem como a seleção e preparação dos materiais constituintes do dispositivo imunocromatográfico.

A biotinilação dos anticorpos foi empregada como estratégia para permitir a captura do complexo imune na linha de teste do dispositivo, por meio da interação biotina–estreptavidina. Para essa finalidade, foram avaliadas duas abordagens metodológicas distintas.

No primeiro protocolo, a biotinição dos anticorpos monoclonais IgG anti-APA foi realizada conforme o procedimento recomendado pelo fabricante do reagente Biotin-NHS Ester (Sigma-Aldrich). Inicialmente, a solução de imunoglobulina purificada por afinidade foi submetida à diálise contra múltiplas trocas de tampão carbonato de sódio 0,1 M ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$), pH 9,5, contendo 0,1% de azida sódica, mantida entre 2 e 8 °C. Após a diálise, a concentração proteica foi ajustada para 20 mg/mL. O reagente NHS-D-biotina foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO - Dimethyl sulfoxide) imediatamente antes do uso, na concentração de 22 mg/mL, e adicionado gradualmente à solução de imunoglobulina em volume correspondente a 10% do volume total, sob agitação suave. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 4 horas. Ao final, a solução foi submetida à nova diálise contra tampão PBS (fosfato de sódio 0,01 M, cloreto de sódio 0,15 M, pH 7,4, contendo 0,1% de azida sódica), mantida entre 2 e 8 °C, para remoção do excesso de biotina livre. O anticorpo biotinilado foi armazenado a -20 °C até sua utilização.

Paralelamente, foi avaliado um segundo protocolo de biotinição, adaptado de metodologias descritas na literatura por Harlow e Lane (1988) e Olovsson e Larsson (1993), para conjugação de IgY. Nesse procedimento, a IgY purificada por cromatografia de afinidade foi inicialmente dialisada contra tampão bicarbonato 0,1 M a 4 °C por 12 horas. Após esse período, a amostra foi centrifugada e a concentração proteica determinada por absorvância a 280 nm. A solução foi então ajustada para a concentração desejada e submetida à reação com NHS-biotina dissolvida em DMSO, seguida de incubação sob agitação à temperatura ambiente por 1h. Para bloqueio da reação, foi adicionado cloreto de amônio (NH_4Cl) 1 M, com incubação adicional por 10 minutos. Posteriormente, a amostra foi submetida à diálise contra tampão Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5, a 4 °C, com trocas sucessivas de tampão. Ao final do procedimento, a solução foi estabilizada com glicerol e armazenada a -20 °C.

Ambos os protocolos foram empregados de forma experimental, com o objetivo de avaliar a estabilidade e a funcionalidade dos anticorpos biotinilados para aplicação futura em ensaios imunocromatográficos, reconhecendo-se a necessidade de ajustes adicionais nas condições de reação e proporções molares para a padronização final do insumo.

Para a confecção do dispositivo de fluxo lateral, foram selecionados materiais comerciais amplamente utilizados em ensaios imunocromatográficos. O papel filtro Whatman, grau 1 (WHA1001150, Sigma-Aldrich), foi utilizado tanto como *conjugated pad* quanto como *absorbent pad*, em função de suas propriedades de capilaridade e uniformidade. Para a revelação do complexo imune, foram utilizadas nanopartículas de ouro coloidal com diâmetro de 20 nm, densidade óptica (OD) 1 (as quais foram conjugadas a IgG anti-APA), estabilizadas em suspensão em tampão citrato (Cat. 741965, Sigma-Aldrich). O *sample pad* foi confeccionado a partir de material de fibra de vidro, selecionado por apresentar melhor compatibilidade com a matriz fecal e por ser o mesmo tipo de material empregado no kit comercial no qual os anticorpos produzidos neste estudo demonstraram funcionalidade. Para a linha de teste, foi utilizada estreptavidina (Scienco, 5 mg, Cat. SSTREP02), visando à captura do complexo antígeno–anticorpo biotilado. A linha de teste do ensaio imunocromatográfico foi preparada por meio da aplicação de estreptavidina em membrana de nitrocelulose, utilizando solução com concentração entre 0,5 e 2,0 mg/mL, diluída em tampão PBS (50 mM, pH 7,4) ou tampão borato, podendo ser suplementada com 1% de trehalose ou sacarose para estabilização proteica. A aplicação da solução foi realizada por *striping*, empregando dispensador automático ou micro-pipetagem manual durante a fase de prototipagem, com taxa aproximada de 1 µL/cm, posicionando a linha de teste a pelo menos 7 mm do “*Sample Pad*”. Após a aplicação, as membranas foram submetidas à secagem e fixação da estreptavidina por incubação a 37 °C por 1 hora ou à temperatura ambiente por, no mínimo, 20 horas, sob umidade relativa inferior a 40%. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com solução contendo BSA (1–3%) ou caseína/leite desnatado (0,3%), a fim de reduzir ligações inespecíficas, e novamente secas antes da montagem final do dispositivo.

Na linha de controle, foram empregados anticorpos anti-IgG murino previamente disponíveis no laboratório, permitindo a validação do fluxo adequado da amostra e da funcionalidade do ensaio. Como suporte estrutural, foram utilizados cartões de membrana de nitrocelulose Hi-Flow Plus HF 180, selecionados em função de sua taxa de fluxo capilar intermediária, adequada para o equilíbrio entre tempo de corrida e eficiência de captura do complexo imune. O desenvolvimento e padronização dos insumos segue em curso.

6. RESULTADOS

6.1 Coleta de material biológico (sangue e fezes) em rebanhos com ou sem histórico de PTB e integração de ações extensionistas

Foram coletadas amostras biológicas de bovinos provenientes de rebanhos com e sem histórico de PTB, localizados em diferentes propriedades rurais, totalizando 27 fazendas, das regiões Norte e Noroeste Fluminense, bem como da Baixada Litorânea do Estado do Rio de Janeiro. Juntamente com as coletas foram realizadas atividades extensionistas de divulgação junto aos produtores de leite e veterinários das regiões. Essa ação incluiu a distribuição de *folders* sobre a PTB e os riscos de ter a doença no rebanho (Figuras 4 e 5).

O QUE É PARATUBERCULOSE?

A Paratuberculose Bovina (PTB) é uma infecção crônica, contagiosa e de difícil tratamento, causada por uma bactéria denominada *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Essa doença causa uma inflamação severa na parede do intestino, afetando principalmente os ruminantes domésticos (bovinos, bubalinos, caprinos e ovinos).

COMO ELA É TRANSMITIDA?

Geralmente a PTB é carreada ao rebanho pela compra de animais infectados. A bactéria é transmitida através da via intrauterina, fecal-oral, colostro e pelo leite de animais infectados, sendo os animais jovens os mais suscetíveis pela imaturidade do sistema imunológico.

VOCÊ JÁ OUVIU FALAR DA PARATUBERCULOSE?

Ela pode estar mais perto do que você imagina!

O QUE ELA CAUSA NA PRODUÇÃO?

- Baixa eficiência reprodutiva;
- Morte dos animais doentes;
- Diminuição da produção de leite;
- Redução do valor da carcaça ao abate;
- Queda na produtividade;
- Descarte prematuro.

QUAIS SÃO OS SINTOMAS?

A bactéria causadora da PTB gera uma inflamação intestinal, que leva à diminuição da absorção de nutrientes de forma crônica, que causa diarreia intermitente, perda de peso progressiva e morte.

Os sintomas surgem geralmente em momentos de estresse como, por exemplo, no peri-parto.

A maioria dos animais infectados permanece sem sinais clínicos, apenas eliminando a bactéria através das fezes.

MEDIDAS DE CONTROLE DA PTB

- Fazer exames periódicos para atestar a ausência ou presença dessa enfermidade no rebanho;
- Manter os recém nascidos em ambiente limpo e recebendo leite de vacas saudas;
- Reduzir o contato de animais jovens com adultos;
- Limpar botas e utensílios antes de tratar dos animais jovens;
- Manter ingredientes da dieta longe do contato de fezes;
- Adquirir animais de boa procedência, se possível com diagnóstico negativo de paratuberculose.

O HOMEM TAMBÉM SE CONTAMINA?

Pesquisas apontam uma possível relação entre a paratuberculose e a Doença de Crohn em humanos. Essa doença geralmente acomete pessoas de 15 a 35 anos, causa diarreia crônica e pode levar à morte.

Caso os riscos para a saúde pública sejam comprovados, o impacto sobre a indústria de carne e leite pode ser devastador. Com essa ameaça a busca pela eliminação da doença e criação de rebanhos livres de PTB deverá ser cada vez mais severa.

Figura 3. Folder informativo sobre a paratuberculose bovina.

Fonte: Elaborado pelo autor.



Figura 4. Coleta de sangue e fezes e trabalho educativo com produtores de leite. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2 Produção de anticorpos anti-APA de captura e de detecção para ensaios imunológicos de diagnóstico da paratuberculose

Para compor o kit ELISA PTB-Detect, foram produzidos anticorpos de captura (anticorpos monoclonais anti-APA) e anticorpos de detecção (anticorpos policlonais anti-APA). Para produção dos anticorpos monoclonais em larga escala, as células de hibridoma 6F/9 armazenadas no nitrogênio líquido foram descongeladas e cultivadas no meio de cultura DMEM-F2 suplementado com 10% soro fetal bovino. O sobrenadante de cultura foi coletado e submetido ao isolamento e concentração dos anticorpos monoclonais (Mabs) por meio de procedimentos de precipitação de 2 etapas, usando ácido caprílico e sulfato de amônio, conforme descrito na seção Material e Métodos. Além disso, uma alíquota dos anticorpos monoclonais de alta qualidade foi produzida gerando o líquido ascítico nos camundongos, para posterior uso no desenvolvimento dos novos métodos imunocromatográficos.

Para a produção dos anticorpos monoclonais no líquido ascítico, 2×10^6 células de hibridoma foram injetadas intraperitonealmente em grupo de oito camundongos da linhagem

BALB/c. Os animais foram anteriormente sensibilizados através da injeção intraperitoneal de adjuvante de Freund incompleto. Após a coleta do líquido ascítico, as imunoglobulinas foram purificadas com ácido caprílico.

Os sobrenadantes de cultura e o líquido ascítico foram submetidos a quantificação de proteínas segundo o método do ácido bicinonínico para determinação proteica. A eficiência da purificação dos anticorpos foi confirmada por meio de eletroforese (SDS-PAGE) a 12% e *western blotting* (**Fig. 6**). No gel obtido (**Fig. 6A**- amostras referentes ao líquido ascítico, e **Fig. 6C** – amostras do líquido ascítico e do sobrenadante de cultura purificadas), verificou-se a separação das cadeias leve e pesada de imunoglobulinas de camundongo, com aproximadamente 24 e 55kDa, respectivamente. O tratamento da membrana pelos anticorpos anti-Ig murino no *western blotting*, confirmou a identidade das bandas das cadeias leve e pesada observadas no gel de SDS-PAGE (**Fig. 6B**).

Os anticorpos anti-APA de detecção foram produzidos nas gemas de ovos das galinhas imunizadas com proteína APA do MAP nos experimentos anteriores, e as imunoglobulinas IgY policlonais foram purificadas com sulfato de amônio e armazenados no *freezer* a -20 °C. As amostras de gemas foram descongeladas, passaram por um processo de diálise, e as amostras de IgY purificada submetidas a SDS-PAGE. Na eletroforese, verificou-se a cadeia pesada das imunoglobulinas IgY, com aproximadamente 75 kDa, respectivamente (**Fig. 6D**). As membranas no WB foram tratadas pelo anticorpo secundário anti-IgY de galinha (**Fig. 6E**).

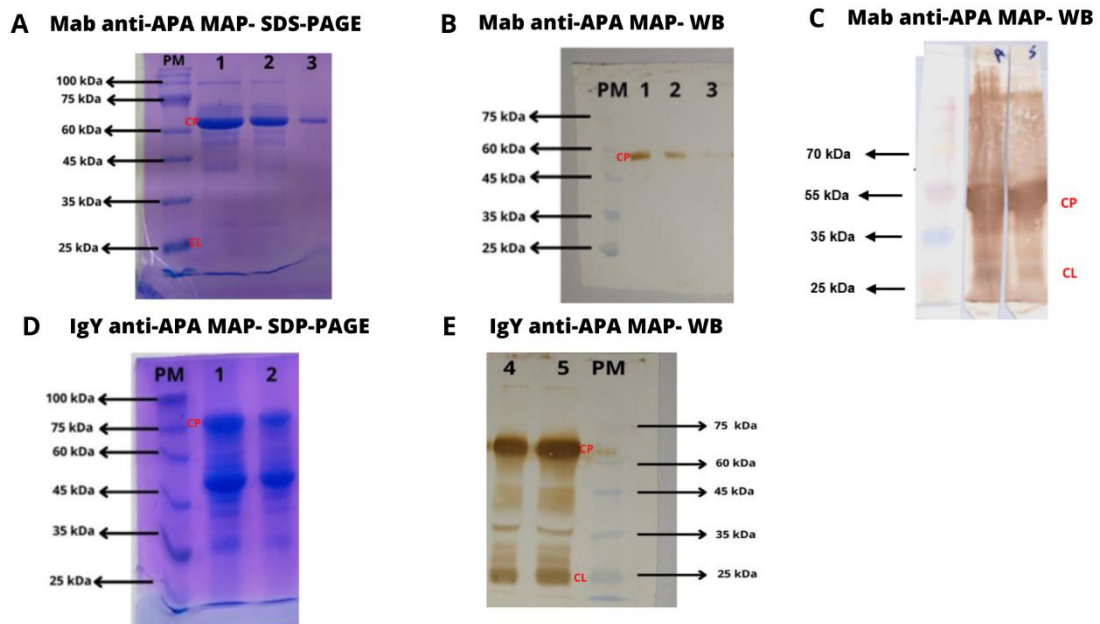


Figura 5. Purificação de anticorpos de captura IgG anti-APA e detecção IgY anti-APA para composição dos testes imunochímicos. As amostras de IgG anti-APA obtidos no líquido ascítico (A, B e C-A), no sobrenadante de cultura de hibridoma (C-S) e nas gemas de ovos de galinha imunizada (D e E) foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE (A e D, gel corado com azul de Coomassie) e posteriormente as proteínas foram transferidas a membrana de nitrocelulose (B, C e E, membranas tratadas pelos anticorpos específicos para imunoglobulinas). No A e B, 10 μ g, 5 μ g e 2 μ g da proteína foram aplicadas nas canaletas 1, 2 e 3, respectivamente. Na C, D e E, 10 μ g de proteína – nas canaletas 1 e 2. As membranas de nitrocelulose foram tratadas pelo IgG de coelho anti-IgG murina (B e C) e com goat anti-chicken IgY- HRP (E) do western blotting. PM – Peso Molecular. *CP- Cadeia Pesada; **CL- Cadeia Leve. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3 Caracterização da população estudada e distribuição geográfica das amostras

A partir das coletas, 249 amostras biológicas foram obtidas de bovinos pertencentes a rebanhos com e sem registro prévio de PTB, provenientes de diferentes propriedades rurais distribuídas pelas regiões Norte e Noroeste Fluminense, além da Baixada Litorânea do Estado do Rio de Janeiro, totalizando 27 fazendas. As coletas abrangeram diversos municípios e distintos sistemas de criação, visando assegurar a representatividade epidemiológica da população avaliada.

As amostras coletadas incluíram fezes e sangue, possibilitando a aplicação de diferentes abordagens diagnósticas ao longo do estudo. Os animais amostrados foram submetidos simultaneamente aos ensaios sorológicos, ao diagnóstico molecular por qPCR considerado padrão-ouro, e ao ensaio imunochímico proposto (ELISA sanduíche PTB-Detect), conforme disponibilidade de material biológico e critérios metodológicos estabelecidos.

A distribuição geográfica das propriedades amostradas e das regiões de coleta está apresentada na **Figura 7**, a qual ilustra a abrangência territorial do presente trabalho e a concentração das amostras nas regiões Norte e Noroeste Fluminense. A coleta amostral cobriu um total de 8 municípios, sendo eles: Campos dos Goytacazes, Cardoso Moreira, São João da Barra, Macaé, Carapebus, Italva, Bom Jesus do Itabapoana e Rio das Ostras. As regiões demarcadas no mapa correspondem a esses municípios. Essa distribuição reflete áreas de relevância para a pecuária leiteira no estado, contribuindo para a avaliação do desempenho dos métodos diagnósticos em condições reais de campo.

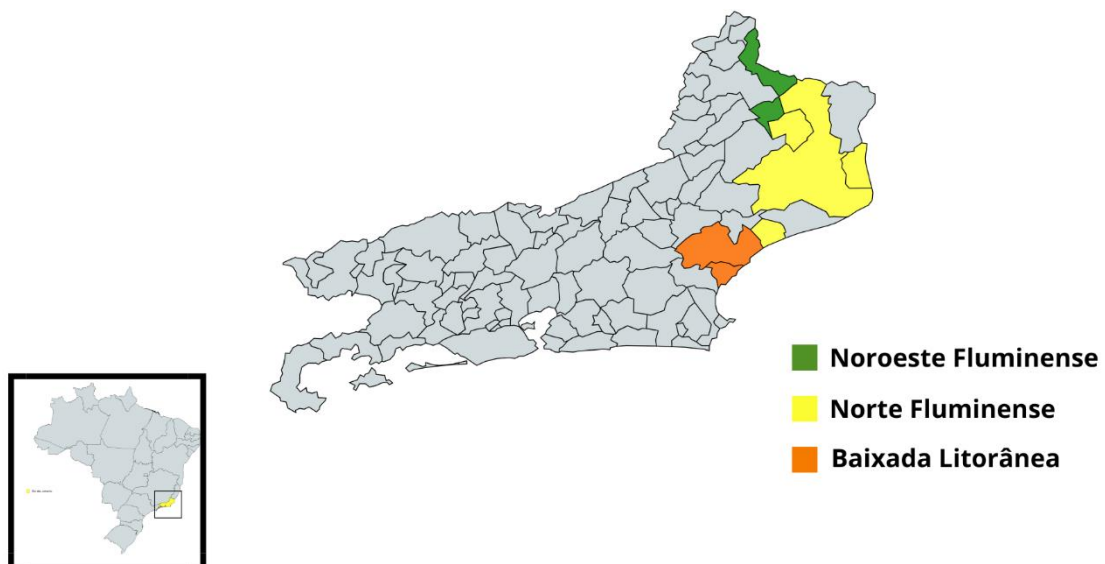


Figura 6. Distribuição geográfica das propriedades e regiões de coleta de amostras biológicas de bovinos incluídos no estudo, localizadas nas regiões Baixada Litorânea e Norte e Noroeste Fluminense do estado do Rio de Janeiro. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.4 Perfil sorológico dos rebanhos avaliados por ELISA comercial

O perfil sorológico dos animais incluídos no presente estudo foi avaliado por meio de ELISA comercial (*kit* comercial PARAS-4P ID-Vet Screen® *Paratuberculosis Indirect Screening test* (França)), utilizando amostras soro provenientes de 244 bovinos, uma vez que três animais não apresentaram volume de soro suficiente para a realização da análise, bem como desconsideramos os animais controle. Os resultados obtidos permitiram a caracterização da sororreatividade dos rebanhos avaliados, inicialmente de forma agregada por mesorregião e, posteriormente, de maneira detalhada por município de origem.

A **Tabela 1** apresenta a distribuição dos resultados sorológicos segundo mesorregião, incluindo animais classificados como soropositivos, soronegativos e suspeitos. Observou-se a presença de animais reagentes em todas as mesorregiões avaliadas, com variação na proporção de sororreatividade entre elas. A maior sororreatividade foi observada na região Norte Fluminense (16,50%), seguida pelas regiões Noroeste Fluminense (11,8%) e Baixada Litorânea (8%). Considerando o conjunto total de animais avaliados, a sororreatividade global foi de 13,11%, calculada a partir da soma de animais soropositivos e suspeitos em relação ao total de animais testados. Na sorologia, das 244 vacas testadas, 24 tiveram suas amostras identificadas como positivas, 8 delas sendo suspeitas e as outras 212 como casos negativos (**Tabela 1 e Tabela 2**).

Tabela 1. Detecção de paratuberculose nas diferentes mesorregiões do Rio de Janeiro por rastreio sorológico. Fonte: Elaborado pelo autor.

Mesorregião	Animais testados	Positivos	Suspeitos	Sororreatividade (%)
Norte Fluminense	139	19 (13,6%)	4 (2,87%)	16,50%
Noroeste Fluminense	17	1 (5,8%)	1 (5,8%)	11,80%
Baixada Litorânea	88	4 (4,54%)	3 (3,4%)	8,00%
TOTAL**	244	24 (9,8%)	8 (3,2%)	13,11%

Com o objetivo de detalhar a distribuição espacial dos animais soropositivos, os resultados foram também analisados segundo o município de origem dos animais.

Tabela 2. Municípios onde foram detectados animais soropositivos pelo teste Elisa comercial.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Municípios	Região	Nº de amostras	Sorologia (+)	Sorologia (-)	Soropositivos (%)
Campos dos Goytacazes	Norte	102	12	90	11,8%
Cardoso Moreira	Norte	5	0	5	0,0%
Carapebus	Norte	10	3	7	30%
São João da Barra	Norte	18	4	14	22%
Italva	Noroeste	1	1	0	100%
Bom Jesus do Itabapoana	Noroeste	15	0	15	0,0%
Macaé	Litorânea	69	4	65	5,8%
Rio das Ostras	Litorânea	16	0	16	0,0%

A **Tabela 2** apresenta a distribuição dos resultados sorológicos por município, considerando exclusivamente os animais classificados como soropositivos e soronegativos, sendo os animais suspeitos excluídos dessa análise para facilitar a visualização da ocorrência de soropositividade nas diferentes localidades amostradas.

Observou-se a presença de animais soropositivos em municípios das três mesorregiões avaliadas, com destaque para municípios pertencentes à Região Norte Fluminense, onde foi registrado o maior número absoluto de animais soropositivos, refletindo assim o maior número de animais amostrados nessa região. Os municípios para os quais não houve resultados positivos na sorologia são: Bom Jesus do Itabapoana (Noroeste Fluminense) e Rio das Ostras (Baixada Litorânea) (**Tabela 2**).

Os resultados foram posteriormente confirmados por métodos mais sensíveis e específicos, uma vez que o teste ELISA comercial apresenta baixa sensibilidade no diagnóstico da PTB devido a forte reatividade cruzada dos anticorpos em epítomos antigênicos compartilhados pelas diferentes espécies de micobactérias, incluindo espécies ambientais que podem induzir a resposta imune anti-micobacteriana nos animais saudáveis, sem PTB.

6.5 Diagnóstico Molecular da paratuberculose bovina por RT-PCR fecal

A partir do *screening* dos animais feito por meio do teste de ELISA comercial (kit comercial PARAS-4P ID-Vet Screen® Paratuberculosis Indirect Screening test (França), foi possível selecionar os animais soropositivos, para realização do teste de detecção da proteína APA-MAP nas fezes através do kit de ELISA fecal (PTB-Detect). Todas as amostras de fezes foram submetidas ao ELISA PTB-Detect.

Para a validação do kit VetMAX™ MAP Real-Time PCR foram selecionadas fezes sabidamente positivas de animais previamente diagnosticados com PTB, eliminando ativamente o MAP e amostras de animais saudáveis. Foram utilizados quatro e oito microlitros de DNA purificados e foram acrescidos 8,5 e 17ul, respectivamente, do mix de reação da RT-PCR para amplificação (não mostrando diferença quanto a amplificação). Os animais considerados positivos foram aqueles que tiveram CT <37 e aqueles que obtiveram CT = ou >40 foram considerados negativos para PTB, segundo as instruções do fabricante. Os

animais positivos foram BT12, SJ1, SJ2, CR, incluindo o animal AA5 utilizado como controle positivo (Figura 8). Foram também utilizadas fezes de animais misturadas com cepa de MAP (Biobanco do LBR – UENF). A **Figura 8** demonstra as curvas geradas pela amplificação do DNA-MAP no gráfico.

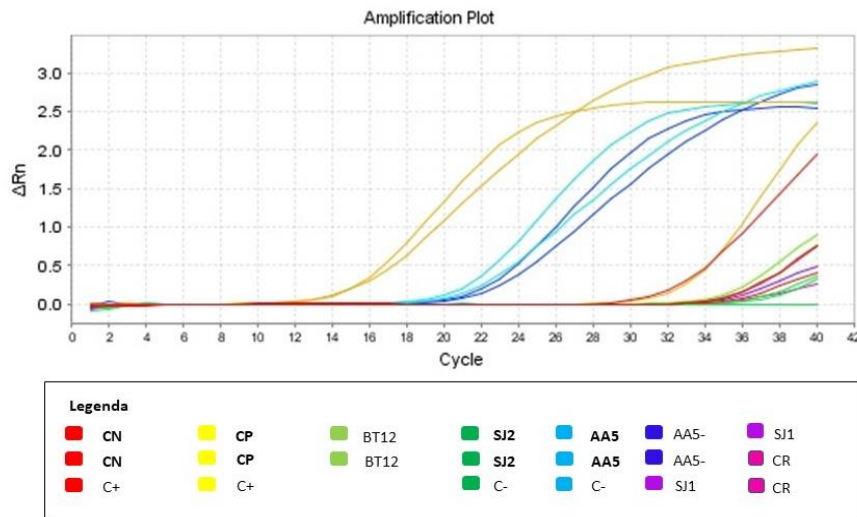


Figura 7. Dados de quantificação do DNA amplificado nas amostras fecais bovinas por *q*PCR.

Legenda com as cores e identificação das amostras logo abaixo. Fonte: Elaborado pelo autor.

O diagnóstico molecular da paratuberculose bovina foi realizado por meio de RT-PCR em amostras fecais, visando à detecção do DNA de MAP. Foram analisadas 240 amostras fecais, considerando os critérios de inclusão e a disponibilidade de material biológico.

A **Tabela 3** demonstra a distribuição dos resultados do RT-PCR fecal segundo a mesorregião de origem dos animais. Observou-se a detecção do DNA do MAP principalmente na região Norte Fluminense, onde 29 amostras (21,0%) foram classificadas como positivas.

Na Baixada Litorânea, foi identificada uma amostra positiva (1,1%), enquanto nenhuma amostra positiva foi detectada na região Noroeste Fluminense. Considerando o conjunto total de amostras analisadas, 28 amostras (11,7%) apresentaram resultado positivo ao RT-PCR fecal. Com o objetivo de detalhar a distribuição espacial das amostras positivas ao diagnóstico molecular, os resultados do RT-PCR foram estratificados por município de origem (**Tabela 4**).

Tabela 3. Distribuição dos resultados do RT-PCR fecal para detecção de MAP em bovinos por mesorregião. Fonte: Elaborado pelo autor.

Mesorregião	Animais testados	Positivos	Proporção de amostras positivas (%)
Norte Fluminense	132	27	21%
Noroeste Fluminense	20	0	0,0%
Baixada Litorânea	88	1	1,1%
TOTAL**	240	28	11,7%

Tabela 4. Distribuição dos resultados do RT-PCR fecal para detecção de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em bovinos por município. Fonte: Elaborado pelo autor.

Municípios	Região	Nº de amostras	RT-PCR (+)	RT-PCR (-)	Proporção de amostras positivas (%)
Campos dos Goytacazes	Norte	98	24	74	25%
Cardoso Moreira	Norte	5	0	5	0,0%
Carapebus	Norte	11	0	11	0,0%
São João da Barra	Norte	18	3	15	17%
Italva	Noroeste	1	0	1	0,0%
Bom Jesus do Itabapoana	Noroeste	19	0	19	0,0%
Macaé	Litorânea	72	1	71	1,4%
Rio das Ostras	Litorânea	16	0	16	0,0%

A **Tabela 4** apresenta a distribuição dos resultados do RT-PCR fecal por município, evidenciando a ocorrência de amostras positivas em municípios pertencentes às regiões Norte Fluminense e Baixada Litorânea. O município de Campos dos Goytacazes concentrou o maior número absoluto de amostras positivas (24 amostras; 25,0%), seguido por São João da Barra (3 amostras; 16,7%) e Macaé (1 amostra; 1,4%). Nos demais municípios avaliados, não foram detectadas amostras positivas ao qPCR fecal.

6.6 Detecção do antígeno APA em sobrenadantes fecais por ELISA sanduíche PTB-Detect (método proposto)

Das amostras de fezes das vacas soropositivas, suspeitas/duvidosas e soronegativas 231 foram submetidas a processamento, conforme o protocolo do novo kit ELISA PTB-Detect (item 5.9). O sobrenadante fecal resultante foi submetido ao novo kit para detecção do antígeno APA-MAP. Como controle negativo utilizamos fezes de animais sadios. Como controle positivo foram utilizadas amostras fecais dos animais AA5 e AA4, gentilmente cedida pela colaboradora Dra. Maria Isabel Romano do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária – Argentina (INTA), os quais se apresentaram assintomáticos no momento da coleta da amostra, mas apresentaram resultados positivos no teste ELISA sorológico e cultura fecal confirmada por análise de PCR para MAP (COSTANZO *et al.*, 2012). Também foi utilizado como controle positivo sobrenadante de cultura de *M. avium* subsp *paratuberculosis*.

Como mostrado na **Figura 9** e nas Tabelas 5 e 6, através do ELISA fecal foi detectado o antígeno APA-MAP no sobrenadante de fezes de 17 animais e 2 foram considerados suspeitos. Os animais AA5, AA4 se confirmaram positivos conforme esperado. Tendo os animais controle e os suspeitos excluídos da tabela.

Detecção do antígeno APA nas fezes de bovinos

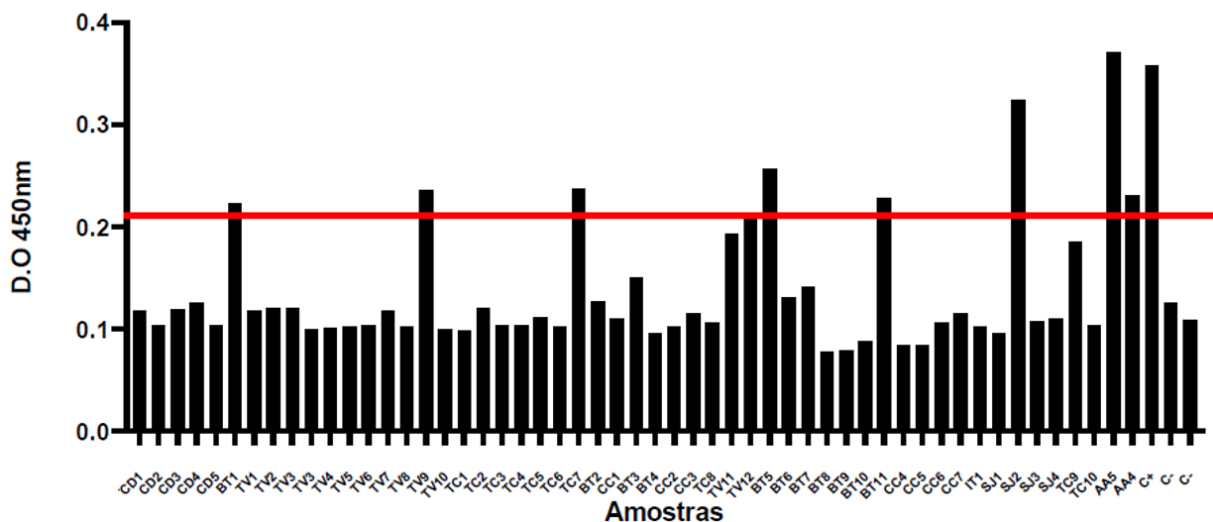


Figura 8. Detecção do antígeno APA pelo kit ELISA PTB-Detect em sobrenadantes de fezes bovinos obtidos nas fazendas da região Norte Fluminense. C - controle negativo (fezes de animal sadio); C+ controle positivo (sobrenadante de cultura de MAP. Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Tabela 5** apresenta a distribuição dos resultados do ELISA sanduíche PTB-Detect segundo a mesorregião de origem dos animais. Observou-se que 11 amostras (4,8%) foram classificadas como positivas no conjunto total de 231 amostras analisadas. As amostras positivas concentraram-se exclusivamente na mesorregião Norte Fluminense, onde 11 de 136 amostras (8%) apresentaram resultado positivo. Nas mesorregiões Noroeste Fluminense e Baixada Litorânea, todas as amostras analisadas foram classificadas como negativas pelo método proposto.

Tabela 5. Detecção do antígeno APA em fezes de bovinos com paratuberculose pelo método proposto ELISA PTB-Detect por município. Fonte: Elaborado pelo autor.

Mesorregião	Animais testados	Positivos	Proporção de amostras positivas (%)
Norte Fluminense	136	11	8%
Noroeste Fluminense	20	0	0,0%
Baixada Litorânea	75	0	0,0%
TOTAL**	231	11	4,8%

Com o objetivo de detalhar a distribuição espacial das amostras positivas ao ELISA sanduíche PTB-Detect, os resultados foram estratificados por município de origem, na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6. Detecção do antígeno APA em fezes de bovinos com paratuberculose pelo método proposto ELISA PTB-Detect por mesorregião. Fonte: Elaborado pelo autor.

Municípios	Região	Nº de amostras	ELISA PTB-Detect (+)	ELISA PTB-Detect (-)	Proporção de amostras positivas (%)
Campos dos Goytacazes	Norte	102	8	94	8%
Cardoso Moreira	Norte	5	0	5	0,0%
Carapebus	Norte	11	0	11	0,0%
São João da Barra	Norte	18	3	15	17%
Italva	Noroeste	1	0	1	0,0%
Bom Jesus do Itabapoana	Noroeste	19	0	19	0,0%
Macaé	Litorânea	64	0	64	0,0%
Rio das Ostras	Litorânea	11	0	11	0,0%

A **Tabela 6** apresenta a distribuição dos resultados do PTB-Detect por município, evidenciando a ocorrência de amostras positivas em municípios pertencentes à mesorregião Norte Fluminense. O município de Campos dos Goytacazes concentrou o maior número absoluto de amostras positivas (8 amostras; 8%), seguido por São João da Barra, com 3 amostras positivas (17%). Nos demais municípios avaliados, não foram identificadas amostras positivas ao método proposto.

De forma geral, os resultados obtidos com o ELISA sanduíche PTB-Detect demonstram a capacidade do método proposto em identificar a presença do antígeno APA em sobrenadantes fecais de bovinos, evidenciando a ocorrência pontual de amostras positivas nas regiões avaliadas. A aplicação do ensaio em condições experimentais padronizadas, permitiu a geração de dados comparáveis aos obtidos por métodos diagnósticos já consolidados, como a sorologia e o diagnóstico molecular por RT-PCR fecal. Nesse contexto, a análise integrada dos resultados provenientes dos três métodos diagnósticos empregados neste estudo torna-se fundamental para a compreensão do desempenho do PTB-Detect, bem como para a avaliação de sua complementaridade em relação às abordagens sorológica e molecular.

6.7 Avaliação do desempenho diagnóstico do ELISA sanduíche PTB-Detect em comparação aos métodos comerciais

A comparação entre os métodos diagnósticos empregados neste estudo evidenciou diferenças importantes no número de animais classificados como positivos, suspeitos e negativos, refletindo as particularidades biológicas e metodológicas de cada abordagem diagnóstica (**Tabela 7**). Vale ressaltar que, na **Tabela 7** foram contados os animais suspeitos e dois animais controle de origem Argentina.

Tabela 7. Resultados comparativos dos métodos imunológicos e moleculares aplicados ao diagnóstico da paratuberculose bovina. Fonte: Elaborado pelo autor.

Métodos Diagnósticos	Números de animais positivos	Números de animais suspeitos	Números de animais negativos	Nº total de animais
PTB-Detect (ELISA Sanduíche)	13 (5,56%)	2 (0,85%)	219 (93,59%)	234
ID Vet Screen Indirect (ELISA Indireto)	26 (10,5%)	8 (3,25%)	212 (86,18%)	246
Vet Max (qPCR)	30 (12,20%)	4 (1,63%)	212 (8,18%)	246

O ELISA sanduíche PTB-Detect, método proposto neste estudo para a detecção do antígeno APA em sobrenadantes fecais, identificou 13 animais positivos (5,6%), 2 animais classificados como suspeitos (0,9%) e 219 animais negativos (93,6%), considerando um total de 234 animais avaliados. Esses resultados indicam um perfil conservador de detecção, com baixa frequência de resultados suspeitos, sugerindo a possibilidade elevada especificidade do ensaio no contexto das amostras analisadas.

O método sorológico ELISA indireto comercial (ID Vet Screen Indirect) avaliou um total de 246 animais, dos quais 26 (10,6%) foram classificados como positivos, 8 (3,3%) como suspeitos e 212 (86,1%) como negativos. Observou-se, nesse método, uma maior proporção de animais positivos e suspeitos quando comparado ao PTB-Detect, o que é compatível com a natureza da sorologia, que reflete a resposta imune humoral do hospedeiro e pode detectar animais em diferentes estágios da infecção, incluindo aqueles sem eliminação fecal detectável no momento da coleta (não bacilíferos).

O diagnóstico molecular por RT-PCR fecal (VetMAX) foi realizado em 246 animais, identificando 30 positivos (12,2%), 4 suspeitos (1,6%) e 212 negativos (86,2%). Esse método apresentou o maior número absoluto e proporcional de animais positivos entre os três métodos avaliados, corroborando sua elevada capacidade de detecção direta do DNA do MAP em amostras fecais, tanto em animais eliminadores de bactéria (bacilíferos), quanto animais em remissão (não bacilíferos), cuja resposta imune conseguiu controlar a infecção.

De forma geral, a comparação entre os métodos demonstra que o RT-PCR apresentou maior taxa de detecção de animais positivos, seguido pelo ELISA indireto comercial, enquanto o ELISA sanduíche PTB-Detect identificou um número menor de positivos, com

reduzida ocorrência de resultados suspeitos. Essas diferenças refletem os distintos alvos diagnósticos de cada método — DNA de micobactéria viva ou morta, anticorpos (resposta imune humoral) e antígeno secretado pela micobactéria viva— e evidenciam que os testes não são diretamente equivalentes, mas complementares na avaliação da paratuberculose bovina. A detecção do antígeno pode melhor correlacionar com a detecção de animais que eliminam micobactérias vivas, o que ainda deve ser verificado pela inclusão de mais um ensaio diagnóstico – teste bacteriológico (isolamento de cultura bacteriana).

6.8 Verificação da funcionalidade dos anticorpos que compõe o kit ELISA PTB-Detect em teste imunocromatográfico

Inicialmente realizamos a testagem dos anticorpos monoclonais anti-APA MAP e policlonais IgY anti-APA MAP como anticorpo de detecção e captura, respectivamente, seguindo o protocolo do kit *Universal Lateral Flow Assay* – ab270537. O anticorpo policlonal IgY anti-APA MAP foi utilizado como anticorpo de captura e conjugado com o Lightning-Link® Ulfa-Tag. A reação foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Utilizamos uma amostra de animal sabidamente PTB-positivo (AA5), como controle positivo.

O resultado obtido demonstrou a presença do antígeno APA, confirmando a funcionalidade dos anticorpos utilizados no teste (**Figura 10**). Outras amostras que se demonstraram positivas foram SJ2 e BT11 os quais foram positivos no novo kit ELISA PTB-Detect, em processo de validação, bem como na sorologia (PARAS-4P ID-Vet Screen® Paratuberculosis Indirect Screening test). Entretanto, no diagnóstico molecular (kit VetMAX™ MAP Real-Time PCR) tais amostras foram consideradas negativas.

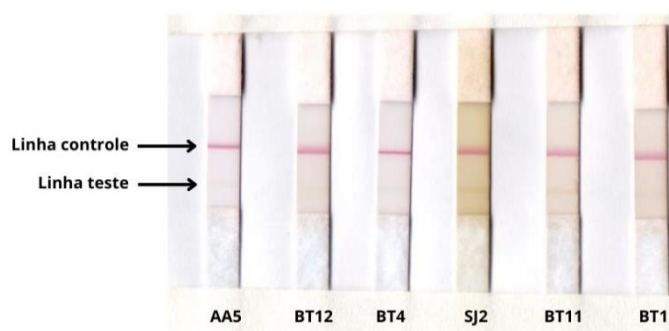


Figura 9. Verificação do funcionamento dos anticorpos monoclonal anti-APA e policlonal IgY em imunocromatografia. Ensaio validado pela linha controle (indicada pela seta). IgY anti-APA policlonal sendo testado como anticorpo de captura e IgG anti-APA monoclonal como anticorpo de detecção, ambos na

concentração de 1mg/ml. Os sobrenadantes fecais foram diluídos em tampão de corrida na concentração de 2:1. Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma nova testagem foi realizada afim de aumentar a intensidade da linha teste nas amostras positivas. Concentramos mais o tampão de corrida ao invés de diluir 1:10 no momento de seu preparo foi feita a diluição em 1:1 para posterior diluição das amostras. Outra mudança, foi ao diluir as amostras no tampão de corrida, ao invés de diluirmos 2:1 (100µl de amostra+ 50µl do tampão universal de corrida 0,1% BSA) a diluição foi ajustada para 1:1 (50µl de amostra + 50µl do tampão universal de corrida 0,1% BSA). Como demonstrado na **Figura 11** o objetivo foi alcançado, é possível observar a linha teste com mais intensidade nas amostras positivas (AA5, TV12, BT11, BT1 e SJ2). Diferente do demonstrado na **Figura 10** o sobrenadante fecal do animal BT1 apresentou o antígeno APA, bem como demonstrado no kit ELISA PTB-Detect. Enquanto os as vacas AA5, BT11 e SJ2 continuaram sendo consideradas positivas (**Figuras 10 e 11**). No sobrenadante fecal do animal BT4, em ambas as testagens, não foi detectado o antígeno APA, bem como nos diferentes métodos diagnósticos aqui descritos, o novo kit ELISA PTB-Detect, kit comercial PARAS-4P ID-Vet Screen® Paratuberculosis Indirect Screening test, VetMAX™ MAP Real-Time PCR. O animal BT4 foi considerado como livre da PTB.

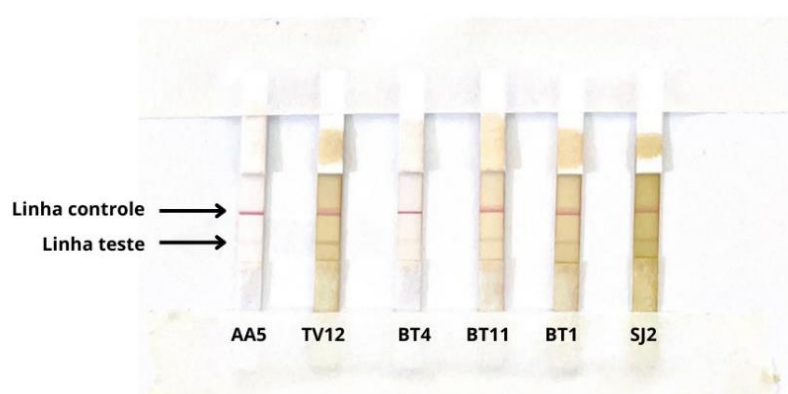


Figura 10. Verificação do funcionamento dos anticorpos monoclonal anti-APA e policlonal IgY em imunocromatografia. Ensaio validado pela linha controle. IgY anti-APA policlonal sendo testado como anticorpo de captura e IgG anti-APA monoclonal como anticorpo de detecção, ambos na concentração de 1mg/ml. As amostras fecais foram diluídas em tampão de corrida na diluição 1:1. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados do teste imunocromatográfico demonstram que os anticorpos anti-APA produzidos no LBR podem ser utilizados para desenvolvimento do novo teste rápido para o diagnóstico da PTB em fezes.

6.9 Idealização de um protótipo para o teste PTB fecal RAPID (Imunocromatográfico)

A partir de estudos iniciais, o protótipo para o teste imunocromatográfico PTB fecal RAPID baseia-se na detecção do antígeno Apa presente em amostras de fezes de animais com paratuberculose (PTB). No modelo proposto, a amostra contendo o antígeno é aplicada na extremidade de uma fita de nitrocelulose, permitindo que ela percorra o dispositivo por capilaridade. Um conjugado de anticorpos IgY anti-Apa biotinilados reage com o antígeno na área de aplicação (*sample pad*).

Ao migrar, o complexo antígeno-anticorpo passa pelo *conjugated pad* (CP) onde reagem com os anticorpos monoclonais IgG anti-APA conjugados a ouro coloidal. O complexo imune então é capturado na linha de teste (T) por estreptavidina livre, onde forma uma coloração indicativa da presença do antígeno. Na linha de controle (C), anticorpos anti-IgG murina capturam os anticorpos IgG conjugados a ouro coloidal restantes, confirmando o fluxo adequado e a funcionalidade do teste (**Figura 12**).

Essa abordagem preliminar possui todos os componentes necessários para viabilidade de um teste rápido e eficaz para diagnóstico de PTB em amostras fecais. Nos próximos passos colocaremos o modelo proposto em prática e iniciaremos sua avaliação.

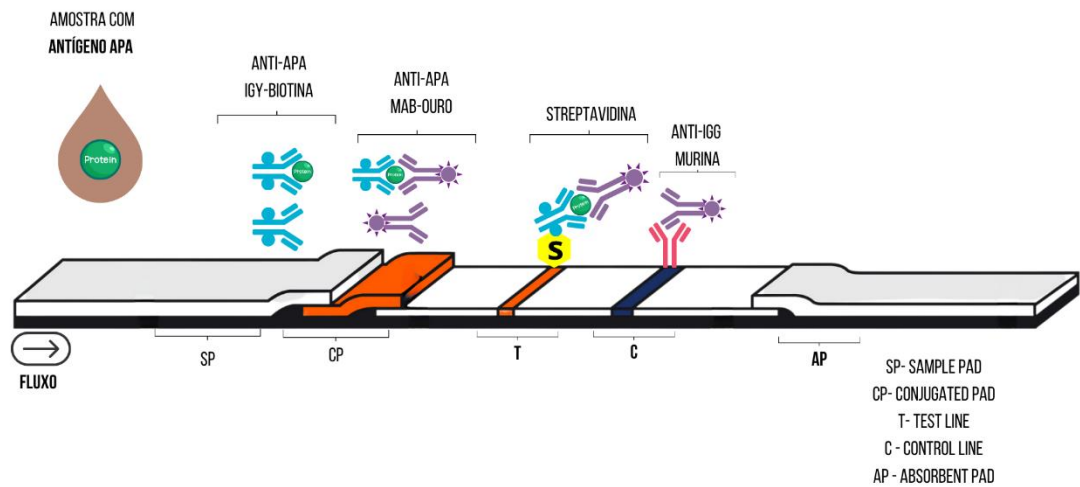


Figura 11. Esquema representativo do funcionamento do protótipo do teste imunocromatográfico PTB fecal RAPID. O esquema ilustra o princípio de funcionamento do teste imunocromatográfico de fluxo lateral para a detecção do antígeno Apa em amostras fecais de bovinos com *PTB*. A amostra é aplicada no sample pad e migra por capilaridade ao longo da fita de nitrocelulose. O antígeno Apa presente na amostra reage inicialmente com anticorpos IgY anti-Apa biotinilados, formando complexos imunes. Durante a migração, esses complexos interagem com anticorpos monoclonais IgG anti-Apa conjugados a nanopartículas de ouro coloidal no conjugated pad. O complexo resultante é capturado na linha de teste (T) por estreptavidina livre, gerando uma coloração visível indicativa da presença do antígeno. Na linha de controle (C), anticorpos anti-IgG murina capturam os anticorpos conjugados a ouro coloidal remanescentes, confirmando o fluxo adequado e a funcionalidade do ensaio. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.10 Produção de insumos para o teste rápido imunocromatográfico

A partir da aplicação das metodologias descritas para a produção de insumos do teste rápido imunocromatográfico, foi possível estabelecer um modelo preliminar de preparo dos componentes essenciais ao desenvolvimento do protótipo anti-APA. Os anticorpos monoclonais e policlonais anti-APA foram submetidos a dois protocolos distintos de biotinylation, permitindo a obtenção de conjugados biotinilados estáveis, adequados para etapas subsequentes de padronização.

Paralelamente, foram selecionados e preparados os materiais estruturais do dispositivo imunocromatográfico, incluindo membrana de nitrocelulose Hi-Flow Plus HF 180, *sample pad* de fibra de vidro, *conjugated pad* e *absorbent pad* confeccionados a partir de papel filtro

Whatman grau 1, bem como nanopartículas de ouro coloidal de 20 nm para a revelação do complexo imune. A definição desses insumos baseou-se em critérios de compatibilidade com amostras fecais, fluxo capilar e viabilidade experimental, possibilitando a montagem inicial do modelo do teste rápido.

O protótipo foi testado com amostras positivas e negativas previamente confirmadas pelos testes convencionais para PTB. A intensidade da coloração foi registrada em uma escala de 0 a 3. Por enquanto, os resultados demonstram a necessidade de ajustes no protótipo e no protocolo de execução. No entanto, até o momento, os experimentos encontram-se em fase de padronização dos reagentes e ajustes das condições operacionais, não sendo ainda estabelecidos parâmetros finais de desempenho analítico, caracterizando o protótipo como um desenvolvimento tecnológico em andamento.

7 DISCUSSÃO

A paratuberculose bovina caracteriza-se por uma infecção crônica e progressiva, marcada por um longo período subclínico, resposta imune heterogênea e eliminação intermitente do agente nas fezes, fatores que tornam o diagnóstico laboratorial particularmente complexo. Os resultados obtidos neste estudo refletem claramente essa complexidade, evidenciando que o desempenho dos métodos diagnósticos varia de acordo com o alvo biológico avaliado — resposta humoral, material genético ou antígeno livre — e com o estágio da infecção, conforme amplamente descrito na literatura (WHITTINGTON *et al.*, 2019; BARKEMA *et al.*, 2018).

Revisões recentes reforçam que essa variabilidade diagnóstica não representa falhas metodológicas isoladas, mas sim uma consequência direta da patogênese da doença, na qual a resposta do hospedeiro ocorre tardiamente em relação à colonização e à eliminação ambiental do MAP (MOHAN & KUSHWAHA, 2024).

A avaliação sorológica por ELISA comercial demonstrou variabilidade na detecção de animais soropositivos entre mesorregiões e municípios, resultado consistente com a natureza da resposta imune humoral na paratuberculose. A produção de anticorpos contra o MAP está associada predominantemente a estágios mais avançados da infecção, quando ocorre a transição da resposta imune celular para a humoral (STABEL, 2010). Nesse contexto, Mohan e Kushwaha (2024) destacam que os testes baseados em anticorpos são intrinsecamente limitados para o diagnóstico precoce, uma vez que a resposta humoral se estabelece quando os animais já estão eliminando bacilos no ambiente.

Dessa forma, a sorologia tende a subestimar a prevalência da infecção em rebanhos compostos majoritariamente por animais subclínicos, o que explica a discrepância observada entre os resultados sorológicos e os obtidos por métodos fecais neste estudo. Esses achados reforçam o papel da sorologia como ferramenta de triagem populacional e monitoramento sanitário, porém com limitações importantes quando utilizada isoladamente para o diagnóstico individual, especialmente em programas de controle baseados na identificação precoce de animais infectados.

O diagnóstico molecular por qPCR em amostras fecais foi adotado como padrão-ouro neste trabalho por permitir a detecção direta do DNA do MAP através de amplificação. Os resultados evidenciaram a presença de animais positivos distribuídos em diferentes regiões e propriedades, confirmando a circulação do agente nos rebanhos avaliados. No entanto, conforme ressaltado por Mohan e Kushwaha (2024), mesmo os métodos moleculares apresentam limitações relacionadas à eliminação intermitente do patógeno, à variabilidade da carga bacteriana e à presença de inibidores na matriz fecal, fatores que impactam diretamente a sensibilidade diagnóstica. Essa característica foi igualmente observada neste estudo, no qual animais classificados como negativos ao qPCR apresentaram resultados discrepantes em métodos imunológicos, refletindo a dinâmica complexa da infecção e corroborando a noção de que nenhum método isolado é capaz de identificar todos os animais infectados em um único ponto amostral (WHITTINGTON *et al.*, 2019; MOHAN & KUSHWAHA, 2024).

Nesse contexto, o desempenho do ELISA sanduíche PTB-Detect, método proposto neste estudo, destaca-se como uma alternativa complementar aos métodos tradicionais. Os resultados demonstraram que o PTB-Detect apresentou um perfil mais conservador de detecção, com menor proporção de animais positivos e baixa frequência de resultados suspeitos. Esse comportamento sugere elevada especificidade do ensaio, característica desejável para métodos baseados na detecção direta de antígenos, especialmente quando aplicados a amostras fecais, que apresentam alta complexidade matricial.

A literatura aponta que testes baseados na detecção de antígenos micobacterianos tendem a identificar preferencialmente animais em fase de eliminação ativa do patógeno, o que pode explicar a menor taxa de positividade observada em relação à sorologia (FELLER *et al.*, 2007; WHITTINGTON *et al.*, 2019).

A eliminação intermitente do MAP e de seus antígenos nas fezes, especialmente em animais subclínicos, impacta diretamente a performance de métodos baseados na detecção fecal, incluindo testes antigênicos (WHITTINGTON *et al.*, 2019). Além disso, a literatura destaca que a presença de antígenos secretados, como o Apa, pode variar de acordo com o estágio da infecção, a carga bacteriana intestinal e o momento da coleta da amostra (MOHAN & KUSHWAHA, 2024). Assim, a menor sensibilidade observada para o PTB-Detect reflete a complexidade da doença e reforça a necessidade de interpretação integrada dos resultados,

especialmente quando comparados a métodos baseados em alvos distintos. Além de enfatizar a necessidade da ampliação do número amostral para análises mais aprofundadas chegando a cálculos de sensibilidade e especificidade.

A análise comparativa entre sorologia, qPCR e PTB-Detect evidencia que esses métodos não devem ser considerados concorrentes, mas sim complementares. Enquanto a sorologia é mais informativa em estágios avançados da infecção, o RT-PCR é fundamental para a identificação de animais eliminadores ativos, e o PTB-Detect apresenta potencial como ferramenta específica para detecção antigênica fecal, com elevada especificidade e utilidade para a confirmação da presença do agente em amostras com menor risco de falsos positivos. Essa abordagem integrada está em consonância com as recomendações atuais da literatura, que enfatizam a necessidade de estratégias diagnósticas combinadas para a paratuberculose bovina, especialmente em função da heterogeneidade imunopatológica da doença (BARKEMA *et al.*, 2018; WHITTINGTON *et al.*, 2019; MOHAN & KUSHWAHA, 2024).

Após essa análise integrada torna-se pertinente discutir os resultados obtidos com os testes rápidos baseados na plataforma de fluxo lateral (LFA), avaliados nos tópicos finais deste estudo. Os LFAs têm sido propostos como ferramentas de diagnóstico rápido e de fácil execução, particularmente em cenários de campo e regiões com infraestrutura limitada. Mohan e Kushwaha (2024) destacam que, embora essas plataformas apresentem vantagens operacionais significativas, seu desempenho diagnóstico depende fortemente do antígeno utilizado, da matriz amostral e do estágio da infecção.

A idealização do protótipo do teste rápido PTB fecal RAPID representa um avanço tecnológico em andamento, alinhado às recomendações atuais para o desenvolvimento de métodos *point-of-care* (PoC). Revisões recentes destacam que testes rápidos baseados em antígenos micobacterianos podem desempenhar papel estratégico no controle da paratuberculose, especialmente em regiões com acesso limitado a laboratórios especializados (BARSHEVSKAYA *et al.*, 2019; MOHAN E KUSHWAHA, 2024). No presente estudo, o desenvolvimento do protótipo encontra-se em fase de padronização de insumos e protocolos, sendo os resultados apresentados como parte do processo de validação tecnológica.

De forma integrada, os resultados obtidos demonstram que o ELISA sanduíche PTB-Detect apresenta desempenho promissor como ferramenta complementar ao diagnóstico da

PTB, especialmente quando associado a métodos sorológicos e moleculares. A continuidade do desenvolvimento do teste rápido imunocromatográfico poderá ampliar ainda mais as possibilidades diagnósticas, contribuindo para o monitoramento sanitário e o controle da doença em rebanhos leiteiros.

Em conclusão, apresenta-se uma proposta para a implementação dos novos métodos imunoquímicos, desde que sua validação seja bem-sucedida (**Tabela 8**). Como nenhum teste isolado é perfeito para todos os estágios da PTB, atualmente uma abordagem combinada é recomendada.

Tabela 8. Estratégia atual de diagnóstico da PTB em diferentes cenários de doença e perspectivas de utilização dos novos testes imunoquímicos propostos para o diagnóstico em fezes. Fonte: Elaborado pelo autor.

Estado clínico do gado submetido ao diagnóstico	Abordagens diagnósticas e ensaios atuais	Implementação dos novos métodos imunoquímicos propostos (após sua validação)
Vacas de alto risco/doença ativa	A PCR fecal é o método preferido para resultados rápidos e definitivos.	Ensaio ELISA PTB-Detect fecal – alternativa de menor custo, particularmente útil para detecção de animais com alta ou moderada eliminação de bactéria.
Triagem de rebanho	O ELISA é utilizado inicialmente para detectar anticorpos, seguido por PCR fecal ou cultura para confirmar os resultados positivos (testes de confirmação)	O teste rápido imunocromatográfico anti-APA de diagnóstico fecal será particularmente útil para triagem do rebanho e triagem de animais na compra/venda.
Rebanhos subclínicos/de baixa prevalência	A PCR/cultura fecal é mais eficaz do que os testes de ELISA (sorológico).	Ensaio ELISA PTB-Detect fecal – alternativa de menor custo.

8 CONCLUSÃO

- O diagnóstico da paratuberculose bovina é complexo e influenciado pela natureza crônica da infecção, pela longa fase subclínica e pela eliminação intermitente do MAP.
- Nenhum método diagnóstico avaliado foi capaz de identificar isoladamente todos os animais infectados, evidenciando a necessidade de estratégias diagnósticas integradas.
- A sorologia por ELISA comercial mostrou-se útil para triagem e monitoramento, porém com limitações na detecção de animais subclínicos.
- O RT-PCR fecal confirmou-se como método altamente específico para a detecção do MAP, essencial para a identificação de animais eliminadores, embora com sensibilidade influenciada pela dinâmica de excreção do agente e pela matriz fecal.
- A detecção de animais positivos em diferentes mesorregiões e municípios indica a circulação do MAP nos rebanhos avaliados.
- O ELISA sanduíche PTB-Detect apresentou desempenho promissor, para continuidade de sua validação.
- A avaliação comparativa evidenciou o potencial do PTB-Detect como ferramenta complementar à sorologia e ao RT-PCR em protocolos integrados de diagnóstico.
- Os ensaios imunocromatográficos demonstraram a funcionalidade dos anticorpos do PTB-Detect, monoclonal e policlonal anti-APA, em testes de fluxo lateral.
- A partir desses resultados, foi desenvolvido um protótipo de teste rápido para paratuberculose bovina, atualmente em fase de padronização de reagentes e protocolos.
- De forma geral, o estudo contribuiu para o avanço do diagnóstico da PTB, destacando o PTB-Detect como abordagem inovadora baseada na detecção antigênica fecal e reforçando a importância do uso combinado de métodos diagnósticos em estratégias de vigilância e controle.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, Gaurav et al. Targeted combination antibiotic therapy induces remission in treatment-naïve Crohn's disease: a case series. **Microorganisms**, Basel, v. 8, n. 3, p. 371, 2020.

ALBUQUERQUE, Paulo P. F. et al. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in artisanal coalho cheese commercialized in Brazil. **Food Control**, Amsterdam, v. 96, p. 239–244, 2019.

ATREYA, R. et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: association or causation? **Inflammatory Bowel Diseases**, Oxford, v. 20, n. 10, p. 1919–1930, 2014.

BAKKER, D. et al. Development of an ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 3–4, p. 209–223, 2000. PMID: 17201195.

BARKEMA, Herman W. et al. Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ruminants. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 32, n. 3, p. 1209–1221, 2018.

BARSHEVSKAYA, I. et al. Lateral flow immunoassays for veterinary diagnostics. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 110, p. 113–122, 2019.

BAUMAN, C. A. et al. Diagnostic performance of serologic tests for Johne's disease in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 2, p. 144–152, 2016.

BO, M. et al. Molecular mimicry between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and human proteins: implications in autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v. 18, n. 4, p. 438–447, 2019.

BUITRAGO-LÓPEZ, A. et al. Host–pathogen interactions in paratuberculosis. **Veterinary Research**, Paris, v. 52, n. 1, p. 1–17, 2021.

- CHIODINI, R. J.; VAN KRUININGEN, H. J.; MERKAL, R. S. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 74, p. 218–262, 1984.
- COCITO, C. et al. Paratuberculosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 7, n. 3, p. 328–345, 1994.
- CORNELI, S. et al. Interferon-gamma assay as a diagnostic tool for early detection of paratuberculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 234, p. 110203, 2021.
- DE SOUZA, Giliane da Silva et al. Detection of APA antigen in feces of cattle naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 203, p. 27–35, 2018.
- FACCIUOLO, A. et al. Cross-reactivity in serological tests for paratuberculosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 162, n. 2–4, p. 371–377, 2013.
- FARIA, A. C. et al. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and dairy products. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 38, p. 1–7, 2014.
- FECTEAU, G. Paratuberculosis in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 34, n. 1, p. 209–222, 2018.
- FELLER, M. et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 7, n. 9, p. 607–613, 2007.
- GARVEY, M. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a possible etiological agent in human disease. **Journal of Infection and Public Health**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 121–126, 2018.
- GARVEY, M. Paratuberculosis: a global challenge for dairy production. **Animals**, Basel, v. 10, n. 10, p. 1–20, 2020.

- GIOFFRÉ, A. et al. Characterization of APA antigen in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 135, n. 1–2, p. 64–71, 2009.
- GILARDONI, L. R. et al. Immune response in bovine paratuberculosis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 106, p. 236–245, 2016.
- HARLOW, Edward; LANE, David. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. 726 p.
- HERMONT-TAYLOR, J. et al. Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Gut**, London, v. 47, n. 4, p. 506–514, 2000.
- HOLLAND, C. A.; KIECHLE, F. L. Point-of-care molecular diagnostics. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 51, n. 1, p. 166–172, 2005.
- JUNGERSEN, G. et al. Interferon-gamma assay for diagnosis of paratuberculosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 87, n. 3, p. 303–316, 2002.
- KETTLER, H.; WHITE, K.; HAWKES, S. **Mapping the landscape of diagnostics for infectious diseases**. Geneva: WHO/TDR, 2004.
- KOCZULA, K. M.; GALLOTTA, A. L. Lateral flow assays. **Essays in Biochemistry**, London, v. 60, n. 1, p. 111–120, 2016.
- LOMBARD, J. E. Epidemiology and economics of paratuberculosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 27, n. 3, p. 525–535, 2011.
- MANNING, E. J. B. Paratuberculosis in cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 1–11, 2001.
- MERCK MILLIPORE. **Lateral Flow Assays: Principles, Designs and Materials**. Darmstadt: Merck KGaA. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/diagnostics-testing-and-manufacturing/lateral-flow-assays>.
- MCNEES, A. L. et al. MAP and autoimmune diseases. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, New York, v. 48, n. 2–3, p. 211–222, 2015.

MOHAN, V.; KUSHWAHA, A. A critical review on diagnosis of paratuberculosis in domestic animals. **Veterinary World**, Gujarat, v. 17, n. 2, p. 256–272, 2024.

NASER, S. A. et al. Review of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's disease. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 20, n. 29, p. 9638–9648, 2014.

NIELSEN, S. S.; TOFT, N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 3–4, p. 274–286, 2008.

OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2014.

OLOVSSON, Matts; LARSSON, Anders. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 16, n. 2, p. 145–152, 1993.

PAVLI, P.; GIBSON, P. R. Viewpoint: the use of antimycobacterial (anti-MAP) therapies in the treatment of active luminal Crohn's disease. **JGH Open: Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Hoboken, v. 9, n. 10, e70293, 2025.

POSTIGO, J. P. **Desenvolvimento de testes rápidos imunocromatográficos para detecção de cinomose canina**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

RASMUSSEN, P. et al. Economic impact of paratuberculosis in dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 190, p. 105322, 2021. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2021.105322.

RIDLEY, R. G. Rapid diagnostic tests for infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 10, p. 823–832, 2006. DOI: 10.1038/nrmicro1525.

SECOTT, T. E. et al. Immune responses to APA antigen. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 8, p. 5053–5060, 2001.

SOUZA, Giliane da Silva. **Diagnóstico imunológico da paratuberculose bovina**. 2015. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2015.

STABEL, J. R. Johne's disease: a hidden threat. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 12, p. 283–288, 1997.

TWORT, F. W.; INGRAM, G. L. A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis* Johne and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovines. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 84, p. 517–542, 1912.

WHITTINGTON, R. J. et al. Control of paratuberculosis: diagnostics and management. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 102, n. 1, p. 672–684, 2019.

YAMASAKI, E. M. et al. Diagnosis of paratuberculosis by molecular methods. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 131–139, 2013.