

Carla Dray Marassi



**OTIMIZAÇÃO DE TESTE SOROLÓGICO (ELISA) PARA
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA PARATUBERCULOSE
BOVINA**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Microbiologia
Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Orientadores: Walter Lilenbaum

Walter Martin Roland Oelemann

**Rio de Janeiro
Fevereiro/2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**OTIMIZAÇÃO DE TESTE SOROLÓGICO (ELISA)
PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA PARATUBERCULOSE BOVINA**

Carla Dray Marassi

Orientadores: Walter Lilenbaum e Walter Martin Roland Oelemann

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Aprovada por:

Presidente, Prof. Leila de Souza Fonseca, UFRJ

Prof. José Mauro Peralta, UFRJ

Prof. Maria Helena Feres Saad, Fiocruz

Prof. Walter Oelemann, UFRJ

Prof. Regina Ejzemberg, UFRJ

Rio de Janeiro

Fevereiro/2007

Marassi, Carla Dray
Otimização de teste sorológico (ELISA) para diagnóstico de paratuberculose bovina/ Carla Dray Marassi. Rio de Janeiro: UFRJ/ IMPPG, 2007.
xvii 142f.: il., 31 cm
Orientadores: Walter Lilenbaum e Walter Martin Roland Oelemann
Tese (doutorado) – UFRJ/Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2006.
Referências bibliográficas: f. 110-121.
1. Paratuberculosis 2. *Mycobacteriae* 3. Bovino 4. ELISA. 5. Sorologia
Lilenbaum, Walter e Oelemann, Walter Martin Roland (Orient.).
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. III. Título

A minha linda família:
Irahy Marassi, Mery Dray Marassi,
Bianca Dray Marassi, Carlos Roberto
Camardella de Souza, e meus queridos
animais: Lowe, Tora, Malandro, Maria
Alice, Theodora e Clarisso pela
confiança de sempre.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores e amigos Professor Walter Lilenbaum e Professor Walter Oelemann pelo apoio, estímulo e confiança, vitais para a realização desse trabalho;

A Professora Leila Fonseca, pelo apoio silencioso e ensinamentos diários, minha grande admiração;

Ao Sr. Marlei Gomes da Silva, pelo auxílio técnico de todos os dias, pela amizade e, principalmente, paciência;

A toda equipe dos Laboratórios de Micobactérias e diagnóstico imunológico e molecular pelo apoio e amizade;

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia do Instituto Biomédico da UFF, pelo apoio e colaboração;

Ao Professores: Mauro Peralta, Maria Bellio, Alberto Nóbrega, Maria Helena Silva e respectivas equipes, pela colaboração durante grande parte dos meus experimentos;

À Rachel Ferreira, pela colaboração nos primeiros momentos deste percurso, com dedicação e amizade;

Aos proprietários das fazendas estudadas e seus dedicados funcionários, em especial ao veterinário Flávio Rocha, pelo empenho demonstrado e colaboração;

Às queridas amigas que cultivei durante o doutorado, que transformaram as dificuldades em tarefas pequenas e simples: Ana Carolina da Silva Carvalho, Maria Silvana Alves, Janete da Silva Gonzaga, Keicia Moreira Pinto, Elis Regina da Costa, Eliane de Oliveira Ferreira, Juliana Magalhães Vital Brazil e Paula Carvalhal Lage Von Buettner Ristow;

Às queridas amigas de todos os momentos: Isabella de São Thiago Morand, Adriana Bronzeri e Helena Klen, que souberam esperar com paciência e amizade;

A todos os funcionários da Bicho Bacana, pelo sincero apoio e cafezinhos

Ao CNPQ – pelo apoio financeiro;

Ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG) na pessoa de sua diretora

Prof. Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes;

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação do IMPPG, na pessoa de sua coordenadora Prof. Thaís Cristina Baeta Soares Souto Padrón;

À Prof., chefe do Departamento de Imunologia do IMPPG; Prof. Elvira Maria Saraiva C. Bou-Habib;

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para que mais uma etapa da minha vida fosse completa, meus sinceros agradecimentos.

Trabalho realizado no Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Prof. Walter Lilenbaum e Prof. Walter Martin Roland Oelemann.

RESUMO

OTIMIZAÇÃO DE TESTE SOROLÓGICO (ELISA) PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA PARATUBERCULOSE BOVINA

Carla Dray Marassi

Orientadores: Walter Lilenbaum e Walter Oelemann

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Palavras-chave: paratuberculose – sorologia- ruminantes - imunologia

A Paratuberculose (doença de Johne) é uma doença infecciosa que acomete ruminantes, cujo agente infeccioso é *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). Embora seja reconhecida como um problema epidemiológico na Europa e nos USA, no Brasil, é ainda considerada uma doença exótica, enquanto a tuberculose bovina é ainda endêmica. A tuberculose é controlada nos países europeus e USA, e o desenvolvimento de metodologias diagnósticas para paratuberculose nestes países não leva em consideração a possível ocorrência de co-infecção tuberculosa no rebanho, situação esperada no rebanho nacional. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram aperfeiçoar o teste sorológico ELISA-PPA previamente desenvolvido, de modo a torná-lo mais adequado às condições epidemiológicas brasileiras, demonstrar a reatividade cruzada entre Map e *M. bovis* e investigar novos antígenos que pudessem aumentar a especificidade dos testes diagnósticos. Na primeira etapa deste estudo, o ELISA-PPA otimizado, utilizado para diagnóstico da paratuberculose bovina, apresentou uma sensibilidade de 70% e especificidade de 76,9%, mostrando-se comparável a ELISAs disponíveis comercialmente ($\chi^2 = 0,7$; $p < 1$; $k = 0.5$). Pela análise por ensaio imunoenzimático *Western blot* de soros de animais com infecção tuberculosa reagentes ao ELISA-PPA, foram identificadas quatro bandas protéicas: uma de 32-36kDa, uma de 42kDa e duas outras entre 77 e 90kDa. E, ao se utilizar as proteínas recombinantes MPB70 e MPB83 provenientes de cepas virulentas de *M. bovis* como antígenos de captura em ensaios ELISA, ambas as proteínas foram reconhecidas pelo soro de animais com infecção tuberculosa, mas não reagiram com o soro de animais com infecção por Map. Estes resultados mostraram-se promissores para que em conjunto, ELISAs com MPB70/MPB83 e PPA possam ser sugeridas como ferramentas diagnósticas para paratuberculose.

ABSTRACT

IMPROVEMENT OF AN IN-HOUSE ENZYME-LINKED IMMUNOASSAY (ELISA) FOR BOVINE PARATUBERCULOSIS SEROLOGY

Carla Dray Marassi

Orientadores: Walter Lilenbaum e Walter Oelemann

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Key-notes: paratuberculosis – serology- cattle - immunology

Paratuberculosis (Johne's disease) is an infectious disease of ruminants caused by *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Map). Although paratuberculosis is considered a serious epidemiological problem in Europe and USA, in Brazil this disease is considered an exotic infection, while bovine tuberculosis is still endemic. Tuberculosis is controlled in USA and in countries of Europe; though, diagnostic tests to paratuberculosis do not consider the possibility of co-infection with tuberculosis and the occurrence of cross-reactions between *M. bovis* and Map antigens. Therefore, purposes of this study are: to improve a PPA-ELISA protocol for the national epidemiologic conditions; to demonstrate the occurrence of cross-reactivity between Map and *M. bovis* antigens, and to investigate some new proteins to augment the specificity of ELISAs for paratuberculosis diagnose. In the first step of this study, the improved PPA-ELISA achieved 70% of sensitivity and 76.9% of specificity. This protocol was statistically comparable with other commercial ELISAs ($\kappa = 0.7$; $p < 1$; $k = 0.5$). In the second part of this study, four proteic bands were identified by *Western blot* analysis in sera of animals with tuberculosis infection which reacted with PPA-ELISA: one of 32-36kDa, one of 42kDa and two others between 77-90kDa. Finally, in the third part of this study, two recombinants proteins isolated from a virulent strain of *M. bovis*, MPB70 and MPB83, were used as capture antigen in an ELISA. Both proteins reacted with sera of tuberculous cattle, but they were not recognized by sera of animals with Map infection. The PPA-ELISA with MPB70/MPB83-ELISAs showed promising results, and could be considered a good tool of paratuberculosis 'diagnostic when used concomitantly.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
I. INTRODUÇÃO	
I.1. A DOENÇA.....	
I.1.1. Características Gerais.....	15
I.1.2. Resposta Imunológica.....	16
I.2. CARACTERÍSTICAS DO AGENTE.....	20
I.2.1. Taxonomia e Análise Filogenética.....	20
I.2.2. Microbiologia e Ecologia.....	22
I.2.3. Principais Antígenos.....	24
I.3. EPIDEMIOLOGIA.....	29
I.3.1. Incidência e Distribuição Geográfica.....	29
I.3.2. Suscetibilidade.....	31
I.3.3. Potencial Zoonótico.....	32
I.4. DIAGNÓSTICO.....	34
I.4.1. Exame Direto.....	34
I.4.2. Cultura Bacteriológica.....	35
I.4.3. Histopatologia.....	37
I.4.4. Ensaio Molecular.....	37
I.4.5. Testes de Imunidade Celular.....	38
I.4.6. Testes Sorológicos.....	40
I.5. CONTROLE E MEDIDAS EPIDEMIOLÓGICAS.....	48
II OBJETIVOS.....	50
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
III.1. LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	51
III.2. AMOSTRAS UTILIZADAS.....	51
III.3. ETAPAS.....	52
III.3.1. Etapa de Otimização do ELISA-PPA.....	52
III.3.2. Detecção de anticorpos anti- <i>M.bovis</i> em testes sorológicos de paratuberculose.....	59
III.3.3. Antígenos Purificados.....	61
IV. RESULTADOS.....	
IV.1. ETAPA DE OTIMIZAÇÃO.....	64
IV.1.1. Modificações do Protocolo original do ELISA-PPA.....	64
IV.1.2. Avaliação do desempenho do ELISA-PPA otimizado.....	80
IV.2. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>M.bovis</i> EM TESTES SOROLÓGICOS DE PARATUBERCULOSE.....	84
IV.2.1. Avaliação do desempenho de ELISA-PPA e ELISA-comercial frente a soros de animais com tuberculose.....	84
IV.2.2. Análise de <i>Western Blot</i> dos soros reativos ao ELISA-PPA.....	84
IV.3. ANTÍGENOS PURIFICADOS.....	90
IV.3.1. Ensaio ELISA-MPB70/MPB83.....	90
V. DISCUSSÃO.....	93
V.1. ETAPA DE OTIMIZAÇÃO.....	93

V.1.1. Modificações do protocolo original do ELISA-PPA.....	94
V.1.2. Avaliação do desempenho do ELISA-PPA otimizado.....	96
V.1.2.1. Avaliação dos índices de especificidade e sensibilidade.....	96
V.1.2.2. Comparação do desempenho do teste ELISA-PPA com testes comerciais	98
.....	
V.2. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>M.bovis</i> EM TESTES SOROLÓGICOS DE PARATUBERCULOSE.....	101
V.2.1. Avaliação do desempenho de ELISA-PPA e ELISA-comercial frente a soros de animais com tuberculose.....	101
V.2.2. Análise por <i>Western blot</i> dos soros reativos ao ELISA-PPA	102
V.3. ANTÍGENOS PURIFICADOS.....	105
V.3.1. Ensaio ELISA-MPB70/MPB83.....	105
VI. CONCLUSÃO FINAL.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
ANEXOS: artigos publicados ou aceitos	122

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Quadro 1: Amostras utilizadas na fase de otimização do ELISA-PPA	54
Figura 1: SDS-PAGE do antígeno PPA	66
Gráfico 1: Antígeno sonicado frente a soros controles positivo e negativo	67
Tabelas 1 e 2: Análise estatística dos valores médios de <i>DOs</i> das amostras frente ao PPA sonicado	68
Gráfico 2: Experimentos de pré-adsorção	71
Gráfico 3: Antígenos utilizados na etapa de pré-adsorção	71
Figura 2: Análise SDS-PAGE dos componentes proteicos de <i>M. phlei</i> e <i>M. fortuitum</i>	72
Gráfico 4: Etapa de bloqueio: comparação entre gelatina e caseína	74
Gráficos 5 -6-7-8: cinética de revelação do ELISA-PPA	76-77
Gráficos 9: Soros testados com ELISA após otimização	79
Gráfico 10: Teste de Heterogeneidade entre poços	79
Tabela 3: Resultado dos soros testados pelo ELISA- PPA otimizado	81
Figura 3: Demonstração gráfica do ELISA-PPA otimizado	81
Figura 4: Análise por <i>Western blot</i> dos soros de animais com cultura Map-positivos ou <i>M. bovis</i> -positivos	87
Figura 5: Análise por <i>Western blot</i> dos soros de animais com cultura Map-positivos	88
Gráfico 11: <i>DOs</i> dos 20 soros de animais TB positivos analisados no <i>Western blot</i>	89
Figura 6: Análise por <i>Western blot</i> dos soros demonstrados no gráfico 11	89
Quadro 2: ELISA-MPB70 frente a soros de animais <i>M. bovis</i> -positivos	91
Quadro 3: ELISA-MPB83 frente a soros de animais <i>M. bovis</i> -positivos	91
Gráfico 12: Curva Roc para ELISA-MPB70 /MPB83	91
Tabela 4: Valores médios dos <i>DOs</i> por grupo de soros frente ELISA-MPB70/MPB83	92
Gráfico 13: Comparação diferentes antígenos frente a soros de animais Map-positivos	92
Gráfico 14: Comparação diferentes antígenos frente a soros de animais TB-positivos	92

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E UNIDADES

AGID: *agar-gel immnodiffusion* – imunodifusão em gel de agarose

ATCC[®]: *American Type Culture Collection*

BAAR: bacilo álcool ácido resistente

BCIP/NBT: *blue liquid substrate system for membranes*

°C: graus Celsius

CD: *cluster of differentiation* – grupo de diferenciação

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay* – ensaio imunoenzimático

FC: fixação de complemento

g: grama

IFN- γ : interferon-gama

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

IS: *insertion sequence* – seqüência de inserção

kDa: Kilo-dáton

LAM: lipoarabinomanana

MB: megabases (10^6 bases)

MHC: *Major Histocompatibility complex* – complexo principal de histocompatibilidade

mA: miliampére

mL: mililitro

mm: milímetro

μ g: micrograma

μ L: microlitro

μ M: micromolar

DO: Densidade óptica

pb: pares de bases

PBS: tampão salina-fosfato (*phosphate buffered saline*)

PCR: *polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

p-NPP: para-nitrofenil fosfato

PPA: *protoplasmic paratuberculosis antigen* - antígeno protoplasmático de paratuberculose

PPD: derivado proteico purificado

ROC: *receiver operator characteristics*

rpm: rotações por minuto

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TBST: tampão tris -salina –tween

Th1/Th2: Linfócito T *helper* 1 ou Linfócito T *helper* 2

TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa

TRAF-1: *TNF- receptor- associated-factor-1*

Tris: tris (hidroxi-metil) aminometano

UI: unidades internacionais

V: Volt

W: Watt

I .INTRODUÇÃO

I.1. A DOENÇA

I.1.1. Características Gerais

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (Map) é o agente etiológico de uma gastroenterite severa que acomete ruminantes, conhecida como paratuberculose ou doença de Johne. Johne e Frothingham descreveram a doença pela primeira vez, em 1895 na Alemanha. No entanto, apenas em 1910, Trowt conseguiu isolar o microrganismo e reproduzir a doença experimentalmente no gado (Harris & Barletta, 2001).

A doença se caracteriza por uma diarréia crônica e intermitente com eliminação do microrganismo pelas fezes. Animais jovens e recém nascidos apresentam os maiores riscos de adquirirem a infecção. Os mais novos podem ser infectados durante o aleitamento, quando entram em contato com as tetas contaminadas por fezes, ou pelo consumo de alimento contaminado pelas fezes de animais portadores (Reichel *et.al.*,1999). Uma infecção fetal pode ocorrer particularmente em vacas prenhes em estágio avançado da doença (Bassey & Collins 1997).

Após a infecção inicial, segue-se um longo período de infecção subclínica, com pouca ou nenhuma excreção do microrganismo; esta fase poderá perdurar por dois a cinco anos, e Map prolifera no intestino, eventualmente nos linfonodos mesentéricos e, algumas vezes, por todo o corpo. Em ruminantes, geralmente, o foco da infecção é a região do jejuno-íleo. Como em outras infecções micobacterianas,

ocorre a formação de um granuloma no sítio da infecção, porém a patologia mais comum relacionada à sintomatologia clássica da doença é uma enterite granulomatosa difusa com espessamento da mucosa intestinal, e grande infiltrado de macrófagos (Aho, McNutty & Coussens, 2003).

A paratuberculose bovina evolui em três etapas: na primeira, o animal está contaminado, mas não apresenta sintomas ou elimina o microrganismo. Na segunda fase, após algum tempo, o animal, apesar de ainda não apresentar os sintomas clínicos, passa a eliminar o agente nas fezes. Nesse estágio, o rebanho como um todo pode demonstrar sinais de infecção por apresentarem alta incidência de mastite, subfertilidade e baixa produção de leite, que geralmente antecede a ocorrência da diarreia. Isto ocorre pela diminuição da capacidade da mucosa intestinal em absorver nutrientes. No estágio final, ocorre diarreia, não responsiva a qualquer tratamento, acompanhada por perda de peso. Tal quadro clínico frequentemente evolui para caquexia e morte (Chiodini, Van Kruiningen & Merkal, 1984).

O sinal clínico que primeiro levanta a suspeita para a doença é a diarreia aguda ou intermitente, com fezes escuras que podem apresentar bolhas. Em alguns casos, o gado parece responder à terapia de suporte; podem ocorrer períodos de remissão da sintomatologia durante semanas ou meses, com ou sem tratamento. Alguns relatos sustentam que em períodos de estresse, tais como prenhez, parto, má nutrição, aumento da produção leiteira e infecções parasitárias podem precipitar o começo da doença (Anonymous-Australian Animal Health Council, 2001).

I.1.2. Resposta Imunológica

Os bovinos são geralmente infectados por Map em idade jovem, ou como recém nascidos por ingestão de material fecal contaminando alimento, ou através do leite e colostro com a presença de microrganismos (Chiodini, Van

Kruiningen & Merkal, 1984). Acredita-se que as células M das placas de Peyer são as portas de entrada por onde Map invade os linfonodos, como ocorre com outros microrganismos intracelulares, por exemplo, *Salmonella sp.* As células M não apresentam microvilosidades, bordos em escova, enzimas digestivas, ou produção de muco em sua superfície celular, o que facilitaria a fixação do microrganismo neste local. A bactéria atravessa a célula M por transcitose. Uma vez expelida, poderá ser então envolvida por macrófagos ou células dendríticas. Até este momento, a bactéria continua intacta dentro do fagócito, ou poderá ser processada e apresentada aos linfócitos T (Stabel, 2000).

Macrófagos infectados tornam-se ativados e produzem IL-1, que ativará linfócitos T em concomitância à apresentação antigênica através de moléculas MHC II para linfócitos T CD4⁺ (auxiliadoras) e moléculas MHC I para linfócitos CD8⁺ (citotóxicas). Em seguida, linfócitos T ativados irão produzir IL-2, que causará a expansão clonal de ambas as populações de células T citadas (Stabel, 2000).

A inflamação local está associada à resposta imune citotóxica do tipo Th1, caracterizada pela expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 e IL-12. Os constituintes das micobactérias, componentes da parede celular e lipopolissacarídeos são capazes de diminuir os mecanismos de defesa dos macrófagos, que utilizam as vias do ácido nítrico e queima respiratória (*respiratory burst*) para matar os microrganismos fagocitados por eles. A evasão ou a resistência aos macrófagos são os pré-requisitos para a persistência e multiplicação da micobactéria e o desenvolvimento da doença. A presença de Lipoarabinomanana (LAM) na parede celular de Map é responsável pela inativação de macrófagos. A sobrevivência intracelular da bactéria, mesmo na presença de altas concentrações de citocinas, provavelmente desempenha um importante papel na formação das lesões

inflamatórias. Map e seus constituintes não apresentam nenhum efeito tóxico direto (Clarke, 1997). A intensa resposta inflamatória do trato intestinal ao microrganismo contribui diretamente com a diminuição da absorção de nutrientes e assim, com o declínio do estado nutricional do animal infectado.

Com a evolução da infecção e multiplicação bacteriana, ocorre um aumento gradativo de resposta imunológica tipo Th2, que estimula a produção de imunoglobulinas IgG1. Nos estágios mais tardios da infecção, nota-se a grande presença destes anticorpos, que suprimem a resposta Th1 (citotóxica), mas não são capazes de assegurar proteção contra Map (Aho, McNutty & Coussens, 2003).

Em outras infecções micobacterianas, considera-se que as populações de linfócitos T MHC restritas (CD4+ e CD8+), em conjunto com células T $\gamma\delta$ estão envolvidas na proteção contra Map e que a citocina IFN- γ é essencial para a ativação celular. Células T $\gamma\delta$ parecem desempenhar um importante papel durante os estágios iniciais da infecção, onde interagiriam primeiramente com células T CD8+ e subsequentemente com células T CD4+. Em bezerros, a população de linfócitos T $\gamma\delta$ representa 40% da população total de linfócitos destes animais, sofrendo um decréscimo na fase adulta, quando representam 5% da população total de células T. Esta subpopulação de linfócitos pode ser encontrada na superfície epitelial e reage com antígenos apresentados por MHC de classes I ou II. Células T $\gamma\delta$ são citotóxicas para células infectadas por micobactérias e produzem IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Acredita-se que sua presença maciça em bezerros seria a principal razão do longo período de latência observado em animais jovens (Stabel, 2000).

A exposição crônica ao Map e a consequente resposta inflamatória no tecido lesionado poderiam causar uma modificação no padrão da expressão genética das citocinas relacionadas. Alguns estudos demonstram uma maior expressão de IL-1 no

tecido ileal infectado, devido a uma maior intensidade na expressão dos genes codificadores desta proteína. Desta forma, a intensa resposta inflamatória intestinal contra Map poderia ser considerada uma intoxicação frente à alta produção local desta citocina, e não somente relacionada à quantidade de microrganismos presentes no sítio de infecção (Aho, McNutty & Coussens, 2003). Macrófagos ativados estimulam a produção de IL-1 até dez vezes mais do que o normal. Esta situação levaria ao aumento da expressão dos receptores TRAF-1 em macrófagos, que têm como função principal impedir os mecanismos de apoptose celular. Esta proteína, associada à TRAF-2 limitariam a produção de CD-40, TNF- α , IL-1 e Fas, que mediarão a morte celular programada (Coussens, 2004).

Desta forma, percebe-se que o nível da resposta humoral se correlaciona diretamente com a multiplicação, disseminação e porta de entrada do microrganismo. Estudos recentes propuseram a não ocorrência de uma troca de resposta pró-inflamatória para uma resposta imunológica predominantemente humoral, baseada em IgG1. A resposta humoral poderia se desenvolver em qualquer momento da infecção, dependendo da dose e da porta de entrada de Map. Simplesmente, nos estágios finais da infecção, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de citocinas e células supressoras, o único que persistiria seria a produção de IgG1, quando pode se considerar que o animal se encontra em estágio terminal da doença (Coussens, 2004) e a eliminação de Map pelas fezes se torna bastante evidente. Os resultados positivos em testes sorológicos ocorrem geralmente após o início desta fase. No último estágio da doença, em que a sintomatologia é evidente, ocorre uma fase anérgica devido à incapacidade do animal, já depauperado, em reagir adequadamente aos estímulos (Hietala, 1992).

I.2. CARACTERÍSTICAS DO AGENTE

I.2.1. Taxonomia e Análise filogenética

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (Map) é membro da ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, do complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*. Tal complexo contém quatro espécies: *M. avium avium*, *M. avium paratuberculosis* (Map), *M. avium silvaticum* e *M. avium intracellulare*. As subespécies foram designadas tomando-se por base estudos de hibridização de DNA-DNA e análises numéricas taxonômicas (Harris & Barletta, 2001). Map pode ser diferenciado fenotipicamente de *M. avium* e de *M. silvaticum* pela sua dependência à micobactina, sideróforo captador de ferro, e, genotipicamente, pela presença de 15 a 20 cópias do elemento de inserção IS900 (Anonymous - Australian Animal Health Council, 2001). Embora esta seqüência seja amplamente utilizada para o diagnóstico definitivo de paratuberculose, IS900 foi encontrada em *M. cookii*, isolada de uma vaca saudável, o que sugere que a PCR direcionada à detecção deste alvo não seja 100% específica (Englund, Bölske & Johanson, 2002). Elementos de inserção são elementos genéticos, pequenos e móveis que contêm genes relacionados a funções de inserção. A sua localização em genes estruturais causa mutações de inserção. A IS900 possui características únicas: não possui terminais repetidos únicos, não induz duplicação das seqüências de inserção no sítio alvo, possui seqüências alvo homólogas ao genoma e tem inserção orientada (Green *et al.*, 1989). As seqüências genéticas F57, ISMav2 e HspX foram analisadas como alternativas que pudessem aumentar a especificidade do PCR. Embora tais seqüências-alvos não sejam tão sensíveis como as múltiplas cópias de IS900, elas têm se mostrado altamente específicas para Map (Kohler *et al.*, 2001).

A análise dos genes que codificam para o RNA ribossômico de micobactérias resultou na divisão do gênero em dois grupos. O primeiro corresponde as micobactérias de crescimento rápido, representados pelas espécies não patogênicas

isoladas no meio ambiente. O segundo grupo corresponde as micobactérias de crescimento lento, que apresentam potencial patogênico (Harris & Barletta, 2001). Map faz parte do grupo de micobactérias de crescimento lento, sendo provavelmente um dos mais fastidiosos. Como os outros microrganismos desse gênero, Map é um microrganismo intracelular recoberto por uma complexa parede lipídica (Cocito *et al.*, 1994), composta por uma grande quantidade de ácidos micólicos de cadeia longa. A presença de ácidos micólicos diminui a permeabilidade da parede bacteriana, o que confere a este grupo de microrganismos uma forte resistência à lise, variações de temperatura e à ação de antibióticos e quimioterápicos (Allen, 1998). Estudos demonstraram que a presença de ácidos micólicos no envelope de algumas espécies bacterianas, tais como *Corynebacterium sp.*, diminuem a permeabilidade e fluidez da parede celular; no entanto, como os ácidos micólicos de micobactérias são de cadeia longa, a permeabilidade e a fluidez da parede desses microrganismos é ainda menor, o que lhes confere uma maior resistência às condições adversas do meio (Liu *et al.*, 1996).

O tamanho do genoma de Map tem sido estimado entre 4,4 a 4,7Mb. Comparado as outras micobactérias, este é um genoma similar ao de *M. tuberculosis*, com 4,41 Mb, e de *M. bovis*, com 4,4 Mb, mas levemente maior do que o estimado para o genoma de *M. leprae* (3,3Mb). O DNA de Map apresenta uma composição de 69,3% de G+C, semelhante aos DNA do *M. tuberculosis* e *M. bovis*, com 65% e 64%, respectivamente. Nenhum DNA plasmidial endógeno foi ainda descrito em Map (Harris & Barletta, 2001). Análises mais recentes demonstram que o genoma de Map, cepa K10, contém aproximadamente cinco milhões de pares de bases representadas em cromossomo circular com mais de 4.000 genes (Bannantine *et al.*, 2002; Kapur *et al.*, 2003).

A nível de DNA e dependendo da região do genoma estudada, Map apresenta cerca de 98% de homologia com *M. avium*, que causa doença em aves e suínos, e possui homologia total nos genes que codificam para o rRNA. A similaridade genética entre as duas subespécies resulta em uma grande quantidade de antígenos comuns, o que pode levar a ocorrência de reações cruzadas em testes baseados em reações imunológicas. Apesar do alto grau de homologia, as espécies apresentam características fenotípicas bastante distintas, no que diz respeito ao tempo de crescimento em meios de cultura e dependência de micobactina (Manning & Collins, 2001).

Em relação às outras espécies micobacterianas, algumas regiões de seus genomas podem apresentar homologia de até 99%. Tal premissa é verdadeira quanto à caracterização dos genes que codificam os antígenos 85A, 85B, 85C de Map. Neste caso, houve similaridade significativa entre as seqüências do complexo Ag85 de outras espécies de micobactérias. As regiões mais bem conservadas deste complexo estariam envolvidas com a fixação da fibronectina, o que também é verdadeiro em Map onde a região N-terminal desse antígeno seria a responsável por esta característica (Dheenadhayalan *et al.*, 2002).

1.2.2 Microbiologia e Ecologia:

Map é um bacilo álcool ácido resistente (BAAR) de 0,5 x 1,5µm que ocorre em grumos ou em aglomerados. No meio de cultura ágar-gema-de-ovo de Herrold (o mais comumente utilizado), forma colônias rugosas, não pigmentadas, ou rugosas, brancas, firmes e brilhantes. *In vivo*, Map multiplica-se com facilidade, mas seu desenvolvimento *in vitro* é lento, com tempo de geração de dois dias, na presença de micobactina. Embora esta característica seja um forte indício da presença de Map, não pode mais ser considerada como patognomônica, uma vez que *M. avium silvaticum* e

algumas cepas de *M. avium avium* também podem ser dependentes desta substância. Contudo, sabe-se que no caso de *M. silvaticum*, este requerimento não é estável, com perda desta necessidade em subcultivos repetidos. Além disso, *M. silvaticum* cresce em pH 5,5 e sofre inibição na presença de cicloserina (Allen, 1998). O teste de produção da fosfatase alcalina é negativo para Map, porém é positivo para *M. avium* e *M. silvaticum*. *M. avium* causa doença em galinhas, coelhos e suínos, enquanto *M. silvaticum* causa doença somente em galinhas. Map causa doença preferencialmente em ruminantes, sendo os bovinos os hospedeiros mais frequentemente infectados (Harris & Barletta, 2001).

Um estudo de epidemiologia molecular demonstrou a limitada diversidade entre as cepas que infectam ruminantes. Foi analisada a especificidade entre duas seqüências IS900 e a seqüência do *locus* 251. Através de um estudo por *fingerprinting*, ficou demonstrado que amostras de Map isoladas de bovinos e ovinos provenientes de uma mesma região geográfica estavam mais associadas do que os isolados de diferentes regiões, o que sugere uma permutação entre cepas de ambas as espécies de ruminantes (Motiwala *et al.*, 2003).

O agente Map sobrevive no ambiente durante longos períodos. Experimentalmente, o bacilo se mantém viável durante cinco meses em água corrente, nove meses em água empoçada e onze meses nas fezes bovinas. Quando o solo está ressecado, é capaz de resistir durante 47 meses. O microrganismo pode sobreviver congelado a -14°C por pelo menos um ano. Existem alguns indícios de que a sobrevivência do microrganismo seja facilitada em solos ácidos. Os pastos devem ser considerados como fonte de infecção por um ano após a contaminação (Collins, Gabric & Lisle, 1990).

O agente é resistente a inúmeros desinfetantes. Em solução aquosa durante 10 minutos, alguns desinfetantes são capazes de matar o microrganismo, entre eles: formalina 5%, cresóis (diluição 1:32), fenol (diluição 1:40) e hipoclorito de sódio (1:50). Os desinfetantes mais eficientes para descontaminação das fezes são os fenólicos na presença de uma alta concentração de detergente. A função do detergente seria ajudar a penetração do fenol no material orgânico. Map é extremamente resistente ao calor; desta forma, a pasteurização pode não matar a totalidade das células do microrganismo em produtos derivados de leite (Johnson-Ifearulundu & Kaneene, 1997, Australian Animal Health Council, 2001).

I.2.3. Principais Antígenos

Em infecções micobacterianas, pouco se conhece sobre o papel de diferentes proteínas e epítomos na evolução da doença e na resposta imune frente a estas infecções. Sabe-se, no entanto, que tal resposta é o resultado de uma combinação entre as respostas imunes humoral e celular. O estudo da estrutura antigênica de micobactérias, em geral, é dificultado por seu lento crescimento e pela reação cruzada entre antígenos de diferentes espécies de micobactérias e de espécies não-micobacterianas (EL-Zaatari, Nasar & Graham, 1997). A ocorrência dessas proteínas parece ser influenciada pela composição do meio de cultura e tempo de cultivo das micobactérias. Algumas proteínas são encontradas em maior quantidade em culturas novas, enquanto outras o são em cultivos mais antigos (Fifis *et al.*, 1991). Além disso, cepas de Map apresentam diferenças entre si, quanto à distribuição e quantidade de antígenos expressos intra e extracelularmente, que poderiam ser usados para detecção de anticorpos (Gasteiner, Awad-Masameh & Baumgartner, 2000).

A procura de antígenos específicos para a confecção de testes de diagnóstico e para a fabricação de vacinas contra paratuberculose levou à descoberta de inúmeras

proteínas imunoreativas (Harris & Barletta, 2001). Na prática, proteínas que carregam epítopos específicos para linfócitos B poderiam ser utilizadas em testes sorológicos ou confecção de vacinas, enquanto proteínas com epítopos específicos para linfócitos T poderiam ser utilizadas em testes cutâneos, baseados em reações de hipersensibilidade (Cocito *et al.*, 1994). De uma maneira geral, proteínas secretadas por bactérias são primeiramente apresentadas ao sistema imune do hospedeiro, antes das moléculas citoplasmáticas e, portanto têm sido alvo de pesquisas para sua utilização em métodos de diagnóstico sorológico capazes de detectar a doença em seus estágios mais precoces. Map secreta principalmente antígenos polissacarídeos e glicoconjugados para o meio ambiente (Mutharia, Moreno & Raymond, 1997).

A análise da distribuição de proteínas específicas de Map encontradas em filtrados de cultura e extratos celulares revelou quatro grupos distintos de antígenos determinantes: epítopos de Map espécie específicos, antígenos comuns a Map e ao complexo *M. kansasii*; epítopos expressos em um número limitado de micobactérias e epítopos identificados em inúmeros microrganismos (Mutharia, Moreno & Raymond, 1997).

Quarenta e quatro antígenos de Map foram identificados em ensaios de imunoelektroforese bidimensional. Entre as proteínas imunogênicas identificadas encontram-se proteínas de choque térmico, redutases, proteases, proteínas citoplasmáticas e de parede celular, além de muitas outras de função ainda desconhecida (Paustian *et al.*, 2004). Dos antígenos mencionados, 27 reagiram com soro anti-*M. avium* e 24 reagiram com soro anti-*M. bovis* BCG. Apenas 17 foram específicos para Map (Cocito *et al.*, 1994). Em um estudo comparativo entre genomas de Map e *M. avium*, vinte e uma seqüências foram identificadas como sendo específicas de Map. Ao comparar-se os genomas de Map e *M. tuberculosis*, foram

identificadas seqüências comuns a ambos os microrganismos, que, no entanto, estariam ausentes no genoma de *M. avium*, o que foi um resultado inesperado, visto o alto grau de similaridade entre as micobactérias do complexo *M. avium*, em comparação aos genomas de Map e *M. tuberculosis*. Outras 13 seqüências foram mais tarde identificadas como específicas para Map e, dentre estas, oito se repetiram em 39 cultivos de diferentes cepas de Map, isoladas a partir de cinco espécies hospedeiras, com grau de conservação de 100% entre elas. Embora tais seqüências tenham sido identificadas, as proteínas codificadas por elas não têm ainda sua função completamente elucidada. Acredita-se que estejam envolvidas na síntese de alguns aminoácidos e biotina, ou envolvidas na síntese de proteínas regulatórias; mais especificamente o gene MAP2963C foi relacionado com a codificação para uma proteína de alto peso molecular (875 aminoácidos), associado à superfície celular (Paustian *et al.*, 2004). Ainda entre as 13 seqüências supra-citadas, apenas cinco expressaram suas proteínas em quantidade abundante: map0862, map3732C, map2154C, map2963C, map0860. Dentre estes, apenas três proteínas foram reconhecidas no *Western blot* por soros de animais infectados por Map: map0862, map3732C, map2963C. Em conclusão, este estudo sugeriu que MAPO862 seria o melhor antígeno para diagnóstico sorológico ou confecção de vacinas, por sua alta especificidade para Map, além de seu produto ser facilmente expresso em vetores, sem a perda de suas características antigênicas (Paustian *et al.*, 2004).

O complexo A36 foi isolado do citoplasma e pertence a um grupo de moléculas denominadas TMA (macromolécula antigênica termoestável), encontradas em micobactérias, compostas por polissacarídeos, proteínas e lipídeos. Este complexo foi identificado através de um sistema imunoeletroforético bidimensional (Cocito *et al.*, 1994). As proteínas 25kDa e 40kDa parecem ser imunodominantes nas

micobactérias e estão presentes nos derivados protéicos usados em testes cutâneos, como johnina e tuberculina (Gilot & Cocito, 1993).

Micobactérias expressam uma grande variedade de glicoconjugados (glicolipídeos e glicoproteínas) encontrados em sua superfície celular. Glicoconjugados tais como lipoarabinomanana (LAM), glicolipídeos e antígenos secretados ativamente durante o crescimento da micobactéria desempenham um papel importante como moduladores da resposta celular e humoral do animal infectado. LAM é um lipopolissacarídeo de 42kDa ancorado na membrana e inserido na parede celular de micobactérias. É uma molécula bastante imunogênica, que reage fortemente com soro de pacientes humanos com hanseníase e tuberculose e com soro proveniente de animais com paratuberculose. Por ser um componente presente na parede celular de todas as espécies micobacterianas, testes ELISA, que utilizaram a proteína como antígeno de captura, apresentaram baixos índices de especificidade (Fifis *et al.*, 1991; Cocito *et.al*, 1994; Mutharia, Moreno & Raymond, 1997; Reichel *et al.*, 1999; Harris & Barletta, 2001).

Complexo 85(a-b-c), ou MPB59, foi identificado primeiramente nas espécies que formam o complexo *M. tuberculosis* (30kDa) e mais tarde em Map (32kDa). Embora apresentem 72,8% de similaridade entre si, não são reconhecidos pelos mesmos anticorpos monoclonais. Ambos os complexos proteicos são obtidos a partir do filtrado de cultivo celular e 32kDa é capaz de induzir forte estimulação de linfócitos B e T desde os estágios mais iniciais da doença, embora seja mais instável do que 30kDa (Harboe *et al.*, 1998; Amadori *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2004).

As proteínas de estresse hsp60k e hsp65k encontradas no citosol de micobactérias têm-se mostrado antígenos importantes, com propriedades imunomoduladoras em doenças causadas por estas bactérias (Koets *et al.*, 2001). As

proteínas alquilperoxidase redutase C e D (AhpC e AhpD) são expressas constitutivamente por Map e, em situações de estresse, podem também ser secretadas por outras micobactérias do complexo *M. avium* (Olsen & Wilker, 1998).

Há também a proteína de parede celular 34KDa, homóloga à proteína presente em *M. leprae*. Este antígeno carrega dois epítomos específicos para células B e por isso, tem sido pesquisado para o uso no diagnóstico da doença de Johne (Mutharia, Moreno & Raymond, 1997). A proteína de 35KDa, presente em outras micobactérias, também foi identificada em Map e mostrou-se específica frente a soros de animais com paratuberculose, bem como frente a soros de humanos com doença de Crohn (EL-Zaatari, *et al.*, 2002). A distribuição de antígenos nos meios de cultura durante o desenvolvimento do bacilo e a distribuição de epítomos específicos dentre as diversas espécies de micobactérias foi investigada por análise de *immunoblotting* com anticorpos monoclonais contra antígenos de Map (Mutharia, Moreno & Raymond, 1997). Ambas as proteínas 34kDa e 35kDa reagiram com soro proveniente de gado com paratuberculose em estágio clínico e subclínico e não apresentaram reação contra soro de gado vacinado com BCG (Harris & Barletta, 2001). Em um estudo preliminar, desenvolveu-se um teste ELISA com a proteína de 35kDa como antígeno de captura. Segundo El-Zaatari e colaboradores (2002), o teste apresentou resultados positivos em 68% dos animais em fase subclínica da doença. Assim, a proteína 35kDa demonstrou ser uma importante alternativa para aumentar os índices de sensibilidade dos testes diagnósticos de paratuberculose.

De qualquer maneira, independente da tecnologia desenvolvida para isolar novos antígenos, a biologia animal, no que diz respeito à restrição de MHC para reconhecimento antigênico, não se modificou. Há que se considerar a diversidade genética dos animais suscetíveis a esta infecção, o que possibilitaria o reconhecimento

de diferentes epítomos das proteínas que estão sendo pesquisadas para o diagnóstico de paratuberculose. Assim, testes imunológicos baseados em poucos antígenos específicos não parecem ser suficientemente sensíveis para aplicação prática (EL-Zaatari *et al.*, 2002).

1.3. EPIDEMIOLOGIA

1.3.1. Incidência e Distribuição Geográfica

A paratuberculose foi descrita pela primeira vez por John e Frothingham, em 1895; desde então, tem sido detectada com frequência em diversos países, sendo considerada de distribuição mundial. A doença é mais comum em propriedades produtoras de leite, principalmente pelo manejo destas propriedades, onde o rebanho é criado em regime de confinamento ou semi-confinamento. A doença é amplamente difundida na Europa. Um estudo epidemiológico na Inglaterra demonstrou que 17,4% dos rebanhos já apresentaram algum caso clínico de paratuberculose. Na Bélgica, a soroprevalência da paratuberculose nos rebanhos foi estimada em 6% através de um teste ELISA comercial; na Holanda, os resultados variaram entre 2,7% e 6,9% em 31 a 71% dos rebanhos. Na Eslovênia, um estudo realizado ao longo de dois anos indicou 11,59% de prevalência nos rebanhos do país (Ristow *et al.*, 2006). Na Dinamarca, um estudo feito com amostras coletadas em tanques de armazenamento de leite proveniente de 900 rebanhos demonstrou uma prevalência de 70% de reatividade para a infecção (Hermon-Taylor, 2000). Nos EUA, afeta pelo menos 2,9% da população total de gado leiteiro e 0,8% do gado de corte (Merkal *et al.*, 1987). A prevalência da doença varia grandemente de acordo com a região do país entre 1,6% até 18% (Johnson-Ifearegulu & Kaneene, 1997) Em relação aos rebanhos, a percentagem de infectados chega a 33% no Wisconsin (Collins *et al.*, 1996) e 55% no Michigan (Johnson-Ifearegulu & Kaneene, 1997);

Dunn *et. al.*, 2005). Na Califórnia, 9,4% dos rebanhos leiteiros analisados foram positivos, com índices de reatividade de até 14% nas regiões central e sul (Adaska & Anderson, 2003). Dados semelhantes têm sido descritos no Japão, Austrália e Nova Zelândia e em vários países europeus. O programa de controle de paratuberculose proposto pelo governo australiano reduziu a soroprevalência para 1% e de casos clínicos para 0,1% em sete anos (Jubb & Galvin, 2002). Na Coreia, um estudo em soros coletados em 1999 e testados por ELISA demonstrou sororeatividade entre 6,7 a 7,1% para paratuberculose nos rebanhos de todo o país (Pak, Kim & Salman, 2003). Na Costa Rica, um inquérito sorológico encontrou 11,9% de animais infectados, distribuídos por 18,7% dos rebanhos (Dolz *et al.*, 1999). Em Buenos Aires, Argentina, onde a doença é pesquisada desde 1985, um inquérito epidemiológico demonstrou 26,5% de reatividade no rebanho de corte e 56% de soros positivos no rebanho leiteiro (Paolicchi *et al.*, 2003).

No Brasil, casos isolados de paratuberculose têm sido descritos nos últimos anos e há relatos do isolamento de Map na região Sul do país e no RJ e também no Nordeste (Ristow, 2004). A doença é considerada rara, relacionada à importação de animais. Em um estudo epidemiológico no estado de São Paulo, foram coletadas amostras de soro sanguíneo de 20 fazendas de leite. O ELISA demonstrou reatividade em 37,9% dos 403 animais, distribuídos em 95% das propriedades pesquisadas. No Rio de Janeiro, 45 rebanhos foram testados pelo ELISA comercial PARACHECK[®] desenvolvido pela empresa CSL (Austrália). Por este método, foram encontrados 18% de animais reativos, distribuídos em 82% das fazendas (Ferreira, Fonseca & Lilienbaum, 2002). Em 2004, a investigação de dois rebanhos da mesma região geográfica do Brasil, onde animais apresentavam sintomatologia clínica característica da doença, levou ao isolamento de Map, o que reafirmou a presença da bactéria em

território nacional, porém desta vez em animais autóctones, provenientes de fazendas sem importação de gado há cerca de 40 anos. Tal achado caracterizou a doença como um importante problema sanitário e complicador econômico destas propriedades (Ristow, 2004).

I.3.2. Suscetibilidade:

A paratuberculose afeta diversas espécies de ruminantes, domésticas e silvestres, (bovinos, caprinos, ovinos, bubalinos, lhamas, camelos, veados, cervos e antílopes) e pode infectar eqüídeos, roedores selvagens e de laboratório. A transmissão de Map ocorre através da ingestão de fezes contaminadas. O microrganismo é eliminado também no leite, assim o aleitamento e a ingestão do colostro são as principais formas de infecção do bezerro. Map é isolado com mais freqüência no colostro do que no leite da mesma fêmea no período de lactação. Animais com menos de 30 dias de idade são os mais suscetíveis à infecção. Algumas evidências experimentais sugerem que o animal infectado até aproximadamente quatro meses de idade apresenta uma maior probabilidade em desenvolver o quadro clínico da doença (Chiodini, Van Krueningen & Merkal, 1984). O microrganismo pode ser encontrado no leite e no colostro e há relatos de transmissão da infecção para o feto no útero (Collins, 1996).

É estimado que apenas um terço dos animais jovens expostos ao bacilo se tornará cronicamente infectado. Isto depende do número de bacilos que foram ingeridos e os mecanismos de defesa do hospedeiro. A ingestão de um número maior de microrganismos do que o sistema imune possa lidar com êxito resultará na infecção. A dose infectante, no entanto, ainda não foi estabelecida, porém a morbidade sugere que poucos bacilos podem causar infecção; animais que se infectam quando adultos desenvolvem poucas lesões.

A diferente susceptibilidade entre adultos e bezerros não foi ainda definida. A abundância de linfócitos T $\gamma\delta$ no gado quando eles estão mais suscetíveis ao Map e sua peculiar distribuição pelos tecidos da mucosa intestinal, o local preferencial de entrada deste microrganismo, parece estar relacionado com a instalação da infecção nos animais (Bassey & Collins, 1997). Ovelhas, carneiros e veados podem se infectar naturalmente em qualquer idade e desenvolver sintomatologia da doença (Chiodini, Van Krueningen & Merkal, 1984).

Aparentemente, não existem raças de bovinos mais ou menos suscetíveis à doença de Johne. Rebanhos de corte apresentam incidências mais baixas da infecção devido ao tipo de manejo e criação extensiva dos animais, o que os expõe menos às fezes de outros animais do mesmo rebanho.

I.3.3. Potencial Zoonótico:

O potencial zoonótico da doença não está totalmente estabelecido. Mais de 35% dos animais com sintomas da paratuberculose eliminam a bactéria pelo leite, enquanto 10% dos animais subclínicos também o eliminam pela mesma via. O microrganismo parece ser capaz de resistir à pasteurização industrial do leite e assim contaminar a população. O Map está relacionado à etiologia da doença de Crohn, como agente principal ou como um dos fatores de uma enfermidade de etiologia multifatorial (Socket *et al.*, 1992, Collins, 1996; Harris & Barletta, 2001).

Map pode causar inflamação crônica intestinal em uma grande parte de espécies animais. Além de ruminantes, também em monogástricos, tais como suínos e caninos, bem como em no mínimo, quatro espécies de primatas. O microrganismo apresenta tropismo aos tecidos intestinais, independente de sua rota de inoculação (oral, subcutânea, peritoneal ou venosa) (Hermon-Taylor, 2000).

No caso de humanos, o microrganismo tem sido encontrado em 70% dos pacientes com doença de Crohn (Collins, 1996), o que o leva a assumir um papel importante na etiologia desta doença em seres humanos. Seu difícil e fastidioso crescimento em meios de cultivo retarda o total entendimento do papel de Map na doença de Crohn. No entanto, o microrganismo tem sido isolado de tecidos de 5% de pessoas portadoras da doença de Crohn em meios de cultura convencionais. Nove entre dez pacientes apresentam IgA contra proteínas expressas em grande quantidade em Map. Tais proteínas são responsáveis por uma inflamação neural, característica da sintomatologia intestinal desta doença em humanos. Além disso, cerca de dois terços de indivíduos com Crohn tiveram Map identificado através da PCR do alvo *IS900* (Hermon-Taylor, 2000). Novos trabalhos a este respeito têm sido desenvolvidos para elucidar tal suspeita. Este assunto ainda é controverso, com vários estudos que documentam a presença ou ausência da bactéria em pacientes com doença de Crohn (Harris & Barletta, 2001).

O tratamento com drogas antimicrobianas contra micobactérias, mesmo em pacientes imunocompetentes, é bastante difícil devido ao rápido desenvolvimento de resistência frente às drogas usualmente usadas contra bactérias do complexo *M.tuberculosis*. Map, no entanto, tem se mostrado mais suscetível a algumas novas drogas que sofreram alterações químicas para cumprir tal propósito. É o caso de antibióticos sintetizados a partir de *Streptomyces sp.*, tais como rifabutina e claritromicina. Estes agentes têm capacidade de se acumular dentro de macrófagos, onde Map primeiramente reside em animais e provavelmente em humanos. O sucesso do tratamento com tais drogas em pacientes com Crohn seria uma evidência do caráter infeccioso e do envolvimento de Map nesta patologia (Hermon-Taylor, 2000).

I.4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de paratuberculose é considerado difícil devido aos baixos índices de sensibilidade dos testes desenvolvidos até hoje. Os métodos disponíveis até agora, moleculares e imunológicos, falham na identificação de todos os animais e podem produzir uma substancial quantidade de resultados falso-positivos (Collins, 1996). Isto é principalmente verdadeiro nos estágios iniciais da doença, quando a excreção de bacilos nas fezes é muito pequena, assim como a produção de imunoglobulinas em níveis detectáveis. A maior dificuldade no diagnóstico em paratuberculose é a detecção da infecção em animais clinicamente normais (Sockett et al., 1992). O diagnóstico se baseia em cultura e isolamento de Map a partir de amostras fecais, leite ou tecidos de animais suspeitos ou doentes. A cultura e o isolamento da bactéria são considerados padrão ouro de diagnóstico, porém testes sorológicos e ensaios baseados em biologia molecular são bastante empregados, por apresentarem resultados mais rápidos (Whittington, 2002).

I.4.1. Exame Direto:

O exame direto das fezes permite a visualização dos bacilos, mas tem valor diagnóstico duvidoso por sua baixa sensibilidade e especificidade. Amostras fecais ou *imprints* de tecidos são corados pelo método de Ziehl-Neelsen; porém a possível presença de micobactérias ambientais nas fezes pode gerar resultados falso positivos. No caso de eliminação de pouca quantidade de bacilos, as amostras fecais ou os *imprints* de tecidos poderão levar a resultados falso-negativos. Desta forma, mesmo sendo de fácil execução e de baixo custo, seu uso não é recomendado (Anônimo - Australian Animal Health council, 2001).

I.4.2. Cultura Bacteriológica;

O isolamento de Map a partir de amostras fecais, ou de tecidos, é um método considerado 100% específico (Sockett et al, 1992). A cultura de ambas as amostras deve ser fresca com processamento em no máximo 96 horas. Caso não seja possível, permite-se o congelamento a -70°C , com posterior descongelamento em banho-maria a 35°C (Whitlock & Rosenberger, 1990). A cultura a partir de tecidos é considerada mais sensível do que a cultura fecal de animais infectados, desde que sejam coletadas amostras de regiões com lesões mais sugestivas da infecção (Australian Animal Health Council, 2001). Acredita-se que possa haver um aumento de sensibilidade de cultura fecal com a utilização de uma maior quantidade de fezes (Whitlock & Rosenberger, 1990).

O crescimento do microrganismo é o mais fastidioso entre as micobactérias, e sua cultura em laboratório necessita de 8 a 12 semanas de incubação; no meio de cultura, é indispensável a presença de micobactina, substância captadora de ferro, que é necessário ao metabolismo da bactéria. A necessidade de micobactina é uma característica importante para sua identificação, embora algumas cepas de *M. avium* também a necessitem. Porém, o crescimento dessas micobactérias é mais rápido do que o de Map (Whiple & Merkal, 1985).

A maior dificuldade diagnóstica está na incapacidade de identificar animais infectados, porém ainda clinicamente normais. A cultura do microrganismo permite a detecção de animais que estejam em fase excretória e que eliminem mais do que 100 microrganismos por grama de fezes. Porém, a cultura, além de ser lenta, possui apenas 50% de sensibilidade e custo elevado (Sockett *et al.*, 1992; Collins, 1996). A eliminação do bacilo em níveis detectáveis é intermitente e não ocorre nos primeiros estágios da doença (McNab *et al*, 1991). Outra complicação do método seria a fase de descontaminação da amostra fecal ou dos tecidos. Ambos devem ficar em suspensão

com cloreto de benzalcônio ou hexacetilpirídio (HPC), que tem sido o descontaminante mais utilizado, para destruir outras bactérias. Este tratamento tem ação bacteriostática para Map, porém, quando em exposição mais prolongada, tais substâncias podem apresentar uma ação bactericida sobre Map (Chiodini, Van Krueningen & Merkal, 1984). HPC é usado em concentrações que variam de 0,25% a 0,9%, com tempo de descontaminação de 16 a 24 horas, podendo chegar até três dias (Ristow, 2004).

O ágar com gema de ovo de Herrold (*Herrold's egg yolk*), suplementado com micobactina é o meio de cultura mais empregado. Porém, diversos outros também podem ser usados, como o meio de Dubos modificado, Middlebrook 7H9, 7H10 e 7H11, suplementados com micobactina. Uma grande desvantagem da cultura de fezes ou tecido é a complexidade na confecção destes meios de cultura, que podem ser freqüentemente contaminados por fungos. Em estudo desenvolvido por Ristow (2006), que tinha como objetivo central estabelecer um protocolo de meio de cultura para cultivo de Map pelos laboratórios nacionais, ficou demonstrado que o pré-tratamento de amostras tanto de fezes como de tecidos que sofriam centrifugação em conjunto com posterior cultivo em meio de Herrold recomendado pelo *Office International de Epizooties* (OIE) foi o protocolo com menor índice de contaminação e maior recuperação de microrganismos.

A cultura em sistema Bactec, onde se utiliza o meio líquido Bactec 12, contendo fonte de nutriente marcada com radioisótopo $^{14}\text{CO}_2$, pode ser utilizada para o cultivo de Map. O crescimento da micobactéria é detectado por um equipamento, Bactec 460, com maior rapidez que a cultura convencional, entre quatro e sete semanas (Collins, 1996). As dificuldades da utilização deste processo são seu alto custo e o descarte do material radioativo após seu uso.

I.4.3. Histopatologia:

As lesões se caracterizam por seu aspecto difuso e granulomatoso, sem áreas de necrose, hiperemia ou fibrose reacional. Histologicamente, as lesões podem ser do tipo nodular (tuberculóide) ou difuso (lepromatoso). A lâmina própria da mucosa intestinal encontra-se envolvida por macrófagos gigantes. As vilosidades estão distorcidas e corrugadas. As primeiras lesões são tuberculóides e multifocais, mas com a evolução do quadro, tendem a coalescer e obliteram as criptas intestinais. Os macrófagos são encontrados repletos de bacilos. Os linfócitos ocorrem de maneira difusa ou em grumos. Neste estágio avançado da doença, pontos focais de necrose podem ocorrer entre o infiltrado inflamatório. Nos linfonodos, tanto nos estágios clínicos como nos subclínicos, pode-se evidenciar a presença de bacilos álcool ácido resistentes, porém, em menor quantidade nos estágios subclínicos ou iniciais da paratuberculose. A histopatologia pode falhar em detectar a doença durante o estágio subclínico da infecção, pois neste momento, as lesões são mais localizadas e podem conter apenas poucas células gigantes ou macrófagos (Anônimo - Australian Animal Council Health, 2001).

I.4.4. Ensaio Moleculares:

Provas diagnósticas baseadas em seqüências específicas de DNA bacteriano permitem que os microrganismos de crescimento lento possam ser rapidamente identificados. Esta estratégia requer a identificação de seqüências de DNA presentes em Map e ausentes em *M. avium* ou em outras micobactérias (Collins, 1996). A reação da polimerase em cadeia (PCR) tem sido utilizada para a confirmação de culturas positivas e para a identificação de Map em fezes, leite e tecidos (Collins, 1996; Paolicchi et al., 2003). As seqüências de DNA mais usadas no ensaio de PCR são o gene que codifica para o rRNA 16S e o elemento de inserção IS900. Testes diagnósticos que utilizam o elemento de inserção IS900 necessitam de

aproximadamente três dias para seu processamento. Em contraste com o diagnóstico baseado em culturas, nenhum outro teste é necessário para confirmar a identidade do organismo. Outra vantagem seriam os baixos índices de contaminação das amostras com fungos, o que ocorre freqüentemente em culturas bacteriológicas, fecais ou teciduais (Collins, 1996).

A sensibilidade da PCR IS900 como método direto de diagnóstico em amostras clínicas como fezes ou tecidos, no entanto, tem se mostrado similar ou um pouco menor em relação à cultura. Collins (1996) sugeriu a necessidade de pelo menos 10.000 células de Map por grama de fezes para a detecção nestes testes. Acredita-se que a grande quantidade de inibidores presente nas fezes e a dificuldade em removê-los seja o principal motivo deste baixo índice de sensibilidade. Alguns autores encontraram índices de sensibilidade que variaram entre 3 a 23% quando comparados à cultura (Vary *et al.*, 1990; Collins, 1996) No entanto, Garrido e colaboradores (2000) ao utilizarem o método de extração *freeze-boiling*, relataram sensibilidade de 94,1%.

I.4.5. Testes de Imunidade Celular:

O teste alérgico intradérmico foi o primeiro a ser utilizado. Aqui, inocula-se um extrato protéico obtido de Map, johnina, no pescoço ou na prega ano-caudal do animal. Realiza-se a leitura após 72 horas, quando é avaliado se houve uma reação de hipersensibilidade cutânea tardia, causada pela resposta imune celular. A ocorrência de reações falso-positivas é um grande problema deste teste, além das dificuldades de leitura e da falta de padronização dos resultados. Este método não é capaz de diferenciar com segurança entre reações devido a infecções por Map ou reações causadas por *M. bovis*, *M. avium*, *M. tuberculosis* ou *Nocardia farcinus* (Chiodini, Van Kueningen & Merkal, 1984; Clarke, 1997).

Outro teste baseado na imunidade celular é o teste que mede através de um ensaio imunoenzimático a produção de IFN- γ por células T sensibilizadas. A produção de IFN- γ em animais infectados por Map é três vezes maior antes da eliminação do microrganismo nas fezes. Além disso, os níveis de IFN- γ são mais elevados em presença de antígeno de Map do que na presença de substâncias que ativariam a resposta imunológica inata, também capaz de estimular a produção desta citocina. Mesmo assim, tal método tem sido apontado como de baixa especificidade e com grande quantidade de falso-positivos (Mac Donald *et al*, 1999). O teste da produção de IFN- γ *in vitro* utiliza como estímulo antigênico o mesmo PPD de Map usado nas provas intradermais nos animais suspeitos (Collins, 1996).

Em um ensaio conduzido na Dinamarca, país livre de tuberculose bovina, foram relatadas reações cruzadas entre tuberculose e paratuberculose em animais com mais de 14 meses de idade. Este trabalho concluiu que, até que novas formulações de antígenos mais específicos para a paratuberculose estejam disponíveis, a interpretação do teste de IFN- γ deveria ser ajustada de acordo com a região de incidência da doença, para atender às necessidades onde estaria sendo aplicado. No caso da paratuberculose, o teste parece ser mais apropriado como um suporte para avaliação da doença nos animais jovens de uma propriedade (Jungersen *et al.*, 2002). No Brasil, a ocorrência de tuberculose no rebanho é bastante elevada; assim, testes periódicos intradérmicos são efetuados em bovinos como rotina e outros testes, tais como os testes de IFN- γ e ELISA para diagnóstico precoce da infecção tuberculosa também têm sido pesquisados (Lilenbaum, 2000). Uma vez que tuberculose bovina e paratuberculose são determinadas por bactérias do mesmo gênero, existe a possibilidade de ocorrência de reações sorológicas cruzadas entre ambas micobactérias. A diferenciação entre reações de tuberculose e de paratuberculose é,

portanto, de vital importância para o correto diagnóstico de ambas as infecções em nosso país. A tuberculose bovina é causada pela *M. bovis*, enquanto animais infectados pela Map desenvolvem a paratuberculose. Pela grande similaridade entre seus respectivos genes, há uma grande possibilidade de ambas as bactérias compartilharem muitas proteínas, o que seria responsável por reações cruzadas em ensaios diagnósticos para detecção de tuberculose ou paratuberculose bovina (Harboe *et al*, 1998; Köhler *et al*, 2001; Amadori *et al*, 2002).

I.4.6. Testes Sorológicos:

Durante a infecção por Map, o animal desenvolve resposta imune humoral e celular, que podem ser correlacionadas com o estágio da doença. A forma tuberculóide da doença, quando as lesões histopatológicas se restringem a alguns pontos no trato intestinal do animal infectado, está associada a uma vigorosa resposta imune celular (CMI), no início do curso da infecção. Paralelamente à reação imune celular, há a proliferação das células B, que produzem anticorpos contra Map. A forma lepromatosa aparece nos estágios finais da doença e se caracteriza pelo declínio da resposta celular e o aumento da resposta humoral, com títulos de anticorpos elevados (Harris & Barletta, 2001).

Pela necessidade de identificar animais doentes em estado subclínico, testes sorológicos têm sido constantemente aperfeiçoados. Para a detecção de anticorpos contra Map nos animais suspeitos, pode-se utilizar a técnica de fixação de complemento (FC), a imunodifusão em gel agarose (AGID) e, principalmente, o ensaio imunoenzimático (ELISA), que pelas características intrínsecas a esta técnica, tem sido alvo de inúmeros estudos.

A FC é considerada um teste valioso na confirmação do diagnóstico em casos clínicos. Entretanto, além de ser um método de difícil padronização, mostrou-se

insatisfatório para detectar animais com infecção subclínica; os índices de especificidade variam entre 21 a 52%, embora a sensibilidade possa atingir índices de 95 a 97%. Em relação à FC, a AGID mostrou-se superior por sua execução e interpretação serem mais simples, sem diferenças significativas nas taxas de sensibilidade (18,9%) e especificidade (99,4%) de ambos (Hietala, 1992). A AGID pode apresentar um índice de até 100% de especificidade, porém é menos sensível que o ELISA (Harris & Barletta, 2001). Ensaios do tipo ELISA são mais sensíveis do que AGID e FC pela sua capacidade em detectar baixas concentrações de anticorpos (Sockett *et al*, 1992).

Testes sorológicos têm seus índices de sensibilidade e especificidade calculados a partir dos isolamentos do bacilo em amostras de fezes ou de tecidos. Os índices de sensibilidade dos métodos de isolamento a partir de tecidos não são completamente estabelecidos, embora sejam maiores quando o cultivo é feito a partir de lesões características de Map (Anônimo, Australian Animal Health, 2001). A sensibilidade do isolamento a partir de fezes é pobre, quando se considera individualmente cada animal do rebanho (30 a 50%), pois a excreção do bacilo em níveis detectáveis por cultura fecal é irregular e pode não ocorrer durante os estágios iniciais da infecção. Assim, os índices de especificidade dos testes sorológicos em uso podem estar sendo subestimados pelos índices de especificidade estimados para cultura bacteriológica (McNab *et al.*, 1991). O que se sabe é que para cada animal com a doença clínica, cerca de nove outros animais do rebanho apresentam cultura positiva e 10 a 15 outros animais estariam infectados, porém sem eliminação do bacilo ou resposta sorológica detectável. Desta forma, a partir de um caso clínico, pode-se estimar que até 60% do rebanho poderia ser portador de infecção subclínica (Cocito *et al.*, 1994).

O ELISA, apesar de ser um teste de fácil execução, mostrou-se insatisfatório para ser usado como um método individual de diagnóstico da paratuberculose bovina, uma vez que não apresenta índices de sensibilidade e especificidade confiáveis em infecções subclínicas para serem usados como único critério de abate e reposição de animais (McNab *et al.*, 1991). Desta forma, somente testes sorológicos podem não ser suficientes para controlar a doença, sendo mais úteis como testes de triagem para estimar a prevalência de paratuberculose em rebanhos, ou para monitorar rebanhos onde a doença acabou de ser erradicada e deve ser mantida sob controle (Socket *et al.*, 1992). No Brasil, este tem sido recomendado como teste de triagem de rebanhos (Ferreira, Fonseca & Lilenbaum, 2002). Recomendação similar foi feita a partir de pesquisas desenvolvidas em países Europeus, países da Oceania e nos Estados Unidos. O ELISA se mostrou mais sensível do que AGID e FC e pode ser usado a partir de sangue ou de leite. Um estudo comparativo entre os três testes supra-citados (FC, AGID e ELISA) demonstrou discrepância em suas habilidades de detectar os animais infectados (Socket *et al.*, 1992). Isto pode ocorrer devido à variedade genética entre cada animal, ou pela falta de representação de todos os antígenos imunodominantes de Map dentro de cada teste (Harris & Barletta, 2001). Alguns estudos demonstraram que o ELISA não apresenta bons resultados quando leite é usado como espécime clínico. Dependendo do ponto de corte (*cut-off*) usado, os testes comerciais do tipo ELISA com amostras de leite falham na identificação dos animais positivos (Paolicchi, *et al.*, 2003; Klausen *et al.*, 2003). No entanto, foram relatados casos onde animais com resultados positivos de cultura a partir de amostras de leite apresentaram resultados negativos no ELISA utilizando leite como espécime clínico. Estes resultados sugeriram que a eliminação de Map pelo leite poderia ocorrer em estágios subclínicos da doença (Paolicchi, *et al.*, 2003).

A especificidade dos testes ELISA disponíveis atualmente aumentou após a introdução da etapa de pré-adsorção do soro com *M. phlei*. Esta metodologia pretende remover do soro dos animais suspeitos a maior parte de anticorpos que se formaram após infecção ou contato com micobactérias ambientais (Olsen *et al.*, 2001). Para diminuir as reações falso-positivas, dois procedimentos deveriam ser executados. Primeiro, a técnica de preparação dos antígenos de captura e de pré-adsorção deveria ser a mesma, para que haja um aumento da probabilidade de epítomos parecidos serem expostos. Segundo: o ponto de corte (*cut-off*) adotado deveria ser deliberadamente alto (Cox *et al.*, 1991). Isto poderia ser parcialmente alcançado com o uso de um soro controle negativo, que apresentasse um alto índice de reações cruzadas com anticorpos inespecíficos, independentemente do modo de preparação e obtenção do antígeno de captura, que poderia ser obtido por sonicação, fervura ou precipitação (Cox *et al.*, 1991). Existem no mercado internacional testes comerciais que utilizam ELISA com pré-adsorção com *M. phlei* para detecção da doença de Johne nos rebanhos, com especificidade entre 95,4% e 99% (Stabel, 2000).

O ELISA apresenta sensibilidade média por volta de 45%. (Harris & Barletta, 2001). Por ser um teste quantitativo, informa os níveis de anticorpos detectados através de um valor numérico e permite a classificação dos animais como positivos, suspeitos ou negativos, de acordo com o valor do ponto de corte (*cut off*) adotado. É considerado um teste rápido, acurado e de baixo custo para o diagnóstico de paratuberculose (Socket *et al.*, 1992).

O desempenho de ELISAs comerciais para o diagnóstico de paratuberculose é afetado pelo estágio da infecção, como se observa ao se comparar seus resultados com os sinais clínicos e a presença do microrganismo nas fezes. Resultados de ELISA estão disponíveis em até 36 horas, enquanto os resultados de cultura e isolamento

exigem sete a 15 semanas. O ELISA é útil para a identificação de animais em fase de excreção intensa de Map, e assim, ajudaria a reduzir a carga de contaminação ambiental pelo microrganismo (Yokomizo *et al.*, 1991). Fica demonstrado que em níveis baixos de excreção fecal de Map, a sensibilidade do ELISA é de 15%, enquanto que em animais com os sinais clínicos da doença, a sensibilidade é de 87%. (Collins, 1996; Anônimo-Australian Council Health, 2001; Harris & Barletta, 2001). Os níveis de anticorpos aumentam à medida que a infecção progride. Assim, níveis elevados de anticorpos estão correlacionados ao aparecimento dos sinais clínicos (Collins, 1996). Porém, até hoje, não há como demonstrar a partir de que momento a cultura fecal ou ELISA poderão identificar os animais positivos em um rebanho (El-Zaatari *et al.*, 2002).

Embora a natureza bioquímica dos antígenos, carboidratos (como LAM) ou proteicos (proteínas de estresse) influencie a produção de diferentes isotipos de imunoglobulinas, este efeito em bovinos com paratuberculose não é bem definido (Koets *et al.*, 2001). As concentrações de IgG1 e IgG2 no grupo de animais assintomáticos, mas com excreção de Map nas fezes está significativamente alta quando comparada aos níveis desses mesmos anticorpos em animais clinicamente doentes (Koets *et al.*, 2001). Em ensaios sorológicos, a IgA não parece ser um bom parâmetro de comparação, uma vez que sua detecção não é freqüente. A resposta imune com produção de IgM seguiria os mesmos patamares de resposta com IgG, sem nenhuma diferença estatisticamente importante. A comparação entre os níveis de IgG1 e IgG2, quanto a antígenos específicos para ambas as subclasses de IgG, indicaram que o isotipo predominante na resposta imune à infecção de paratuberculose é o IgG1 (Koets *et al.*, 2001). Pesquisas também demonstraram que ELISAs para detecção de IgM contra antígenos de paratuberculose não aumentam a

sensibilidade do teste, uma vez que o gado infectado não parece apresentar níveis elevados de IgM nas infecções por Map (Yokomizo *et al.*, 1991).

Uma outra tentativa de melhorar a especificidade do ELISA consiste na utilização de antígenos Map-específicos. Pode haver uma grande variabilidade nos resultados de ELISA baseados no antígeno de captura escolhido e no procedimento utilizado para cada teste (El-Zaatari *et al.*, 2002). Relativamente, poucos antígenos específicos de Map têm sido caracterizados e avaliados em ensaios imunológicos. O uso de antígenos purificados levaria a uma diminuição da sensibilidade do teste e, portanto, seria melhor a inclusão de um painel desses antígenos, como antígenos de captura, para se obter um teste sorológico de ótima qualidade (Olsen *et al.*, 2001).

A maioria das proteínas de micobactérias purificadas é instável e, provavelmente, a ocorrência dessas proteínas seja influenciada pela composição do meio de cultura e tempo de cultivo. Algumas proteínas são encontradas em maior quantidade em culturas novas, enquanto outras são mais abundantes em cultivos mais antigos (Fifis *et al.*, 1991). Portanto, a resposta imunológica frente a estes antígenos poderia também ser influenciada pelo estágio da infecção, onde em determinada fase, a resposta imunológica poderia ser mais detectável a certo antígeno, em detrimento de outro. Sabe-se, no entanto, que de uma maneira geral, proteínas secretadas por bactérias seriam primeiramente apresentadas ao sistema imune do hospedeiro antes das moléculas citoplasmáticas, e que por este motivo seriam alvo de maiores estudos quanto sua utilização em testes diagnósticos para estágios precoces da infecção (Aho, McNutty & Coussens, 2003).

Inúmeras proteínas com potencial imunogênico foram previamente identificadas, porém poucas existiriam exclusivamente em Map, o que limitaria sua utilização como antígeno. Além disso, uma vez que tais antígenos são, em sua

maioria, conjugados a carboidratos ou lipídeos, quando clonadas apresentam diferenças em relação às proteínas nativas, no que diz respeito a sua conformação e exposição de epítomos, o que poderia diminuir a sensibilidade dos testes (Paustian *et al.*, 2004).

Na tentativa de aperfeiçoar o diagnóstico de paratuberculose, algumas pesquisas procuraram aumentar a especificidade dos testes ELISA ao utilizarem proteínas de micobactérias do complexo tuberculose, para diferenciar entre as infecções micobacterianas mais comuns (Amadori *et al.*, 2002). Desta forma, as proteínas MPB70 (MPT70) e MPB83 (MPT83) têm sido pesquisadas (Harboe *et al.*, 1998; Juaréz, Torres & Espitia, 2001, Pollock, Welsh & McNair, 2005). Estas proteínas foram identificadas em *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Estes antígenos são expressos em baixas quantidades nas cepas BCG Pasteur de *M. bovis*, Copenhagen e Glaxo, porém são sintetizados em altos níveis nas cepas Brasil, Moscou, Suécia e Tokio. São pouco expressas *in vitro*, porém têm um grande potencial imunogênico durante a infecção em camundongos (Juaréz, Torres & Espitia, 2001).

A especificidade dos testes ELISA tem sido considerada mais alta desde que foi introduzida a etapa de pré-adsorção de soros com *M. phlei* (Bech-Nielsen *et al.*, 1992). Contudo, não há relatos sobre a habilidade desta pré-adsorção em distinguir reações de paratuberculose daquelas de tuberculose bovina (Olsen *et al.*, 1998).

O componente LAM de parede celular de micobactérias tem sido um valioso antígeno para ensaios diagnósticos de paratuberculose. LAM demonstrou ser um importante imunomodulador, com capacidade de alterar as funções dos macrófagos durante a infecção do microrganismo (Koets *et al.*, 2001). O ELISA-LAM foi descrito como sendo um teste efetivo para detecção de animais em estágio subclínico da doença. Em programas de controle, o ELISA-LAM poderia ser uma boa opção para

começar a identificar os rebanhos afetados pela infecção (Paolicchi *et al.*, 2003). Porém, os resultados não são conclusivos em relação à capacidade de discriminar animais com paratuberculose ou com tuberculose bovina. Em um estudo, onde um grupo de proteínas foi utilizado como antígeno de captura, as reações cruzadas que ocorreram com o soro de animais com *M. bovis* poderiam ter sido causadas pela presença de LAM como um dos antígenos usados neste ensaio. As mesmas conclusões foram obtidas por Walravens e colaboradores (2002). O teste não foi capaz de distinguir entre animais infectados com tuberculose e paratuberculose. E, ao comparar ELISA-LAM com os testes comerciais, todos apresentaram basicamente o mesmo rendimento (Walravens *et al.*, 2002).

De qualquer maneira, nenhum dos testes aqui citados pode identificar, exclusivamente através de seus resultados, os animais em estágio subclínico que deveriam ser descartados do rebanho infectado, sem o resultado dos testes bacteriológicos (McNab *et al.*, 1991; Whittington, 2002). Dados de pesquisa demonstraram que 80% dos animais infectados soroconvertem antes do início dos sintomas. Setenta por cento excretariam o microrganismo nas fezes e 96% poderiam ser detectados com uma combinação desses dois testes. Em um programa de controle, onde os testes ELISA fossem aplicados em intervalos regulares de seis meses, oitenta por cento dos animais infectados poderiam ser identificados com quase nenhuma deterioração física dos animais e com uma perda econômica mínima (Cox *et al.*, 1991). Considerando-se os testes sorológicos disponíveis, atualmente utiliza-se ELISA, principalmente em testes comerciais, para triagem de rebanhos e identificação de animais em estágio subclínico e a AGID para confirmação de casos mais avançados, onde existe a suspeita clínica da enfermidade (Ferreira, Fonseca & Lilenbaum, 2001).

Os testes diagnósticos comerciais de ELISA, embora amplamente usados em outros países, apresentam um alto custo para utilização no Brasil, além das dificuldades em sua obtenção, devido a barreiras de importação de produtos biológicos. É necessário desenvolver métodos diagnósticos adaptados às condições epidemiológicas de cada região, que permitam a identificação de animais infectados em estágios mais precoces e que possam distinguir a paratuberculose de outras micobacterioses. Os testes comerciais disponíveis foram padronizados em países onde há baixa ou nenhuma ocorrência de tuberculose em seus rebanhos. O teste ELISA-PPA (antígeno protoplasmático de paratuberculose) *in-house*, desenvolvido por Ferreira, Fonseca & Lilenbaum (2001), mostrou-se de fácil execução e interpretação, sendo um método aceitável para triagem e avaliação do rebanho nacional. No entanto, sua otimização faz-se necessária para incrementar os níveis de sensibilidade e diminuir a possibilidade de reações cruzadas com antígenos de tuberculose bovina, doença endêmica no território nacional. O antígeno protoplasmático de paratuberculose (PPA) é atualmente o único antígeno disponível comercialmente, além do PPD-johnina, utilizado em testes intradérmicos, que medem a resposta imune celular do animal contra Map. PPA tem sido usado em ensaios diagnósticos, que identificam a resposta humoral dos animais com paratuberculose.

Segundo seus fabricantes, este antígeno é obtido de *Mycobacterium avium* CEPA 18. As bactérias são rompidas e o lisado é centrifugado para que haja completa remoção da parede celular. O protoplasma é então dializado, centrifugado e liofilizado (Allied monitor, CA, USA).

1.5. CONTROLE E MEDIDAS EPIDEMIOLÓGICAS

Os programas de controle de paratuberculose são diferentes entre os países e regiões onde a ocorrência da infecção é conhecida há mais tempo (Chiodini, Van

Krueningen & Merkal, 1984). De uma maneira geral, os produtores que detectam a infecção em seus rebanhos decidem por descartar os animais com sintomatologia clínica. O controle da doença é ainda prejudicado pelas falhas nos testes diagnósticos existentes. O tempo de incubação prolongado e a presença de casos subclínicos permitem que os animais excretem grandes quantidades do microrganismo pelas fezes antes da infecção ser detectada (Bannantine et al., 2002). E, uma vez doentes, ainda não existem tratamentos efetivos para o controle e remissão dos sintomas no rebanho, embora algumas drogas derivadas de *Streptomyces* sp. tenham apresentado resultados promissores em pacientes com doença de Chron (Hermon-Taylor, 2000).

Diante disto, o controle da enfermidade tem se baseado em medidas de manejo do rebanho, como limpeza das instalações com detergentes específicos, separação dos bezerros de animais adultos e de animais infectados; não permitir o aleitamento de bezerros em vacas infectadas; usar leite pasteurizado proveniente de vacas sabidamente saudáveis para o aleitamento dos bezerros. Além disso, manter o rebanho fechado ou somente adquirir novos animais de propriedades livres da doença (Chiodini, Van Krueningen & Merkal, 1984).

Vacinas contra paratuberculose são usadas comercialmente somente em regiões da América do Norte e Europa onde a paratuberculose acarreta perdas econômicas muito sérias, uma vez que sua eficácia ainda não foi totalmente comprovada (Harris & Barletta, 2001). A vacinação interfere nos resultados sorológicos para detecção de paratuberculose e tuberculose, por aumentarem a ocorrência dos resultados reativos a estes testes, o que poderia levar ao abate ou descarte desnecessários de animais sadios (Munskens *et al.*, 2000). No Brasil, a paratuberculose foi detectada recentemente em nossos rebanhos, sendo até então, considerada uma doença exótica relacionada à importação de animais (Ferreira,

Fonseca & Lilenbaum 2002). Por este motivo, o desenvolvimento de métodos diagnósticos confiáveis é indispensável para uma pesquisa epidemiológica ampla com o estudo do impacto econômico da presença da doença em nosso território, bem como a partir destas conclusões, promover medidas de controle e prevenção.

II. OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho foi a otimização e a padronização de protocolos para diagnóstico sorológico de paratuberculose de modo a adequá-los à realidade nacional. Paralelamente, foi identificada a influência dos anticorpos anti-*M. bovis* nos testes de diagnóstico e com isso, foram avaliadas e sugeridas alternativas para minimizá-la.

Sendo assim, os objetivos específicos foram:

- Aperfeiçoar o protocolo de ELISA desenvolvido previamente pelo laboratório de micobactérias da UFRJ, com antígeno de captura PPA (antígeno protoplasmático de paratuberculose), adequá-lo às condições do rebanho nacional, e aumentar os índices de sensibilidade e especificidade em níveis comparáveis aos alcançados pelos testes ELISA comerciais.
- Identificar por meio de análise em SDS-PAGE e *Western blot* a ocorrência de compartilhamento antigênico em soros de animais com tuberculose frente a antígeno proveniente de *Map* e com isso, caracterizar a interferência de anticorpos anti-*M. bovis* no diagnóstico de paratuberculose.

- Testar antígenos purificados com o objetivo de aumentar a especificidade do diagnóstico sorológico de paratuberculose e propor protocolos alternativos para melhor identificação da infecção em nosso território.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Todas as etapas do estudo foram desenvolvidas no Laboratório de Diagnóstico Molecular e Imunológico, Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, CCS, UFRJ. Os isolamentos de Map a partir de fezes ou tecidos dos animais investigados sorologicamente foram executados pela médica veterinária Paula Ristow (UFRJ), como parte de sua tese de mestrado, no Laboratório de Micobactérias, Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, CCS, UFRJ. Os soros de animais com tuberculose foram gentilmente cedidos pela médica veterinária Suzana Fráguas (UFF), que em sua tese de mestrado, realizou os isolamento de *M. bovis* a partir de tecidos coletados após o abate desses animais, também no Laboratório de Micobactérias citado acima.

III.2. AMOSTRAS UTILIZADAS

Foram utilizadas 203 amostras de soros de bovinos de idade superior a dois anos, de aptidão leiteira, sujeitos à vermifugação periódica e controle de brucelose e tuberculose, de acordo com a legislação nacional (PNCEBT, 2001). Todos os animais eram provenientes de fazendas localizadas no estado do Rio de Janeiro. De 106 destes animais, foram colhidas amostras de sangue total, sem coagulante, e fezes cultivadas para isolamento de Map. As noventa e sete amostras de soro restantes, foram

coletadas de animais abatidos em matadouros oficiais do Estado do Rio de Janeiro, por terem apresentado reação intradérmica positiva para a prova de PPD e serem, portanto, considerados reativos para tuberculose, segundo a legislação em vigor. Desses animais, também foram coletados tecidos, que foram processados para cultivo, baciloscopia direta (pesquisa de BAAR) e exame histopatológico. As amostras de sangue tiveram o soro separado por centrifugação, identificadas e armazenadas em alíquotas de 0,5 a 1mL em criotubos a -20°C, constituindo a coleção de soros de bovinos do Laboratório de Diagnóstico Molecular e Imunológico, UFRJ.

Além desses soros, foram utilizados seis soros reativos e quatro soros não reativos para testes de diagnóstico de paratuberculose provenientes de animais criados em uma área totalmente livre de tuberculose. Tais amostras foram gentilmente cedidas pelo Professor Michael Collins (Wisconsin University – USA). Os soros reativos eram provenientes de animais com resultados positivos para cultura de Map, enquanto os soros negativos eram de animais cujas culturas eram negativas para Map, de rebanhos livres da infecção.

III.3. ETAPAS:

III.3.1. Etapa de Otimização de ELISA-PPA

Nesta etapa, o estudo foi conduzido em duas fases: na primeira, foram feitas modificações no protocolo original do ELISA-PPA desenvolvido anteriormente em nosso laboratório (Ferreira, Fonseca & Lilenbaum, 2002). Estas alterações tiveram o objetivo de tornar os resultados reprodutíveis e reduzir as variações entre placas e entre os poços de uma mesma placa. Para esta etapa, foram utilizados os soros controles positivos e negativos, gentilmente cedidos pelo Professor Michael Collins (USA). Após a otimização do protocolo, o ensaio foi testado perante um painel de 106

amostras de soro para avaliação dos índices de sensibilidade e especificidade do mesmo.

III.3.1.1. Amostras Utilizadas:

Um painel constituído por 106 soros de animais adultos provenientes de rebanhos leiteiros do estado do Rio de Janeiro foi classificado em duas categorias e quatro grupos. A categoria 1 foi composta pelos soros reativos, que seriam utilizados para a avaliação da sensibilidade do teste. A categoria 1 era composta pelo grupo A, com 13 soros de animais com cultura fecal positiva para Map (positivos por cultura) e grupo B com 13 soros de animais sem resultados de cultura, porém cujos soros foram reativos em dois testes ELISA comerciais (Paracheck-CSL - Australia, HerdCheck-Idexx, IDDEX Lab. – USA) e também reagiram ao teste in-house ELISA-PPA (antígeno comercial, Allied Monitor Lab. – USA) - positivos por sorologia. A categoria 2 foi composta pelos soros não reativos, para o cálculo do índice de especificidade deste ensaio. A categoria foi então dividida em grupo C, composta por 39 soros não reativos de animais com resultados negativos para cultura fecal (negativos por cultura) e em grupo D, com 41 soros de animais provenientes de criações sem histórico de paratuberculose, que não reagiram em testes sorológicos comerciais (ELISA-Paracheck, CSL), sendo, portanto negativos por sorologia.

QUADRO 1: Amostras utilizadas na fase de otimização do ELISA-PPA

	<i>A (cultura e sorologia positiva)</i>	<i>B (sorologia positiva)</i>	<i>TOTAL</i>
CATEGORIA 1	13	13	26
	<i>C (cultura e sorologia negativa)</i>	<i>D (sorologia negativa sem histórico de paratuberculose)</i>	<i>TOTAL</i>
CATEGORIA 2	39	41	80

(Painel de soros utilizados para avaliação de sensibilidade e especificidade do ELISA-PPA, divididos em duas categorias e quatro grupos).

III.3.1.2. Protocolo original do ELISA-PPA:

Antígeno PPA (Allied Monitor Lab, USA) foi usado como antígeno de captura, adsorvido em uma placa de 96 poços (Nunc Maxisorb®, Nunc, Denmark). Cada poço foi preenchido por 100µL de uma solução antigênica (10mg/mL: tampão de diluição: Tris 10mM, 0,09% NaCl, 0,2%); a placa com o antígeno foi incubada à temperatura ambiente durante 18 horas e posteriormente bloqueada com uma solução de TBST (Tris 10mM, 0,09% NaCl, 0,2% Tween 20) com gelatina 2%. Na etapa de pré-adsorção dos soros, cada amostra a ser testada foi misturada a um volume igual de extrato de *M. phlei* (Allied Monitor Lab, USA), na concentração de 5mg/mL; as soluções foram incubadas à temperatura ambiente durante uma hora, e em seguida centrifugadas durante três minutos a 2000 rpm (Centrífuga 5415C, Eppendorf-USA). Os soros (concentração: 1/100) foram adicionados aos poços e incubados durante uma hora, à temperatura ambiente. Um anticorpo monoclonal anti-IgG bovino conjugado à fosfatase alcalina (Sigma-USA) na concentração de 1:5000 foi usado para a detecção dos imunocomplexos em um período de incubação de 60 minutos à temperatura

ambiente; a presença dos anticorpos específicos era revelada pela adição de substrato para fosfatase alcalina para-nitrofenil fosfato (p-NPP - (Sigma-Aldrich, USA), na concentração de 1mg/mL, após 15 minutos de incubação sob temperatura ambiente. Três etapas de lavagem com TBST foram incluídas após incubação dos anticorpos primário (a ser pesquisado) e secundário (conjugado). Os soros foram testados em duplicata, na diluição de 1:100. A análise de todos os soros cujas duplicatas apresentaram leituras com variação maior do que 15% entre eles foi repetida. A densidade óptica (*DO*) foi medida por um comprimento de onda de 405nm (modelo 680-BioRad, USA).

III.3.1.3. Modificações do Protocolo do ELISA-PPA:

A) Etapa de Sensibilização:

O protocolo foi modificado para tornar o teste mais reprodutível e minimizar as variações entre placa e entre poços de uma mesma placa. Para isso, cada etapa do teste, bem como seus reagentes, foram analisados. O antígeno PPA (10mg/mL) foi diluído em duas substâncias tampões de diferentes pH, separadamente. Desta forma, utilizou-se: tampão carbonato (0,05 M; pH 9,6), tampão PBS pH 7,4 e PBS pH 8,0 (8g NaCl; 0,2g KH₂PO₄; 2.9g Na₂PO₄ x 12H₂O; 0,2g KCl em 1L de água destilada) . Após a definição do tampão a ser utilizado, PPA foi sonificado em situações de tempo distintas, com duração entre 15 segundos até 75 segundos (75-W cell disruptor, Microson sonicator[®] VCX 400W). Uma vez estabelecidas as condições de sonicação e a substância tampão que conferia maior estabilidade à solução antigênica, o tempo de sensibilização da placa, bem como a temperatura de incubação desta placa durante sua sensibilização foram analisados. Os poços das placas (Nunc Maxisorb[®], Nunc, Denmark) foram preenchidos com esta solução antigênica e sensibilizados em duas maneiras distintas: durante 18 horas a

8°C, ou durante duas horas a 37°C. Para que fosse possível a análise da variação entre poços, as condições de sensibilização foram testadas frente a um soro controle negativo e um soro controle positivo, ambos na diluição de 1:100.

B) Etapa de pré-adsorção:

A etapa de pré-adsorção com extrato de *M. phlei* foi analisada em situações distintas: extrato de *M. phlei* (5mg/mL) foi misturado em partes iguais aos soros diluídos e incubados à 37°C, em constante agitação, durante 60 minutos. Após isto, a suspensão foi incubada durante 18 horas, à temperatura de 8°C, para completar a adsorção. Em uma outra situação, a solução foi aquecida a 37°C, em constante agitação durante 120 minutos, centrifugada durante 3 minutos a 2000 rpm (Centrífuga 5415C, Eppendorf-USA) e posteriormente, distribuída nos poços da placa de ELISA. Os soros foram testados em três diferentes diluições: 1:100, 1:200 e 1:400.

A pré-adsorção de ELISAs comerciais tem sido efetuada com antígeno de *M. phlei*, para evitar a ocorrência de reações cruzadas com antígenos inespecíficos de micobactérias ambientais, o que aumenta os seus índices de especificidade (Collins & Socket, 1993; Harris & Barletta, 2001). No entanto, algumas pesquisas demonstram que no Brasil, *M. fortuitum* é a micobactéria ambiental mais isolada (Leite *et.al.*, 2003). A partir desta observação, *M. fortuitum* foi utilizado em substituição de *M. phlei* na mesma concentração de 5mg/mL e seus desempenhos comparados. *M. fortuitum* (amostra ATCC) foi cultivado a partir da coleção de micobactérias conservada pelo laboratório de Micobactérias (Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes, CCS, UFRJ). Nesta etapa, todos os soros foram utilizados na diluição de 1:100.

B.1) Descrição de SDS-PAGE:

A eletroforese foi feita em sistema SDS-PAGE, pelo método vertical com placas de 10x8cm (Bio-Rad Laboratories, USA), com gel de empilhamento de 4% e um gel de separação a 12%, sob corrente constante de 150V, 120mA, até ser observada a saída do material do gel, o que levava em torno de 90 minutos. *M. fortuitum* (amostra ATCC) foi descongelado e reconstituído em solução salina (0,9%), para que a concentração fosse de 5mg/mL, a mesma concentração sugerida pelo fabricante do antígeno comercial *M. phlei* (Allied monitors- USA). Este antígeno é composto por toda a bactéria liofilizada que é reconstituída em solução salina. Dez microlitros de cada amostra foram misturados à mesma quantidade de tampão de desnaturação de amostra (Tris-HCl 62,5 mM/pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% 2-mercaptoetanol; 0,002% azul de bromofenol) e em cada slot, foi aplicado 2 μ L, 4 μ L, 8 μ L de cada uma das amostras. Como padrão de peso molecular, utilizou-se padrão pré-corado proteico, com marca de pesos moleculares entre 17 e 245kDa (Roti®-Mark prestained, Roth- Alemanha). A coloração dos géis foi feita pelo corante Azul brilhante de Comassie R-250, em temperatura ambiente durante 18 horas, e sua descoloração foi feita através de lavagens contínuas sob agitação com solução descorante (5% metanol (MeOH) e 7% ácido acético (HOAc)).

C) Etapas de bloqueio:

Comparou-se o desempenho da caseína (Sigma-Aldrich, USA) e da gelatina (Sigma-Aldrich, USA) quanto suas capacidades de bloqueio e de dissolução na substância tampão utilizada para a confecção das soluções de bloqueio. Ambas, foram utilizadas nas mesmas concentrações para a confecção destas soluções. A

permanência e a temperatura de incubação das etapas de bloqueio não foram modificadas.

D) Etapa de revelação:

Uma vez que o conjugado utilizado no ELISA anterior era fosfatase alcalina, o substrato (p-NPP) foi mantido e diluído em tampão de dietalonamina pH 9,8 (1mg/mL), conforme as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich, USA). Foi feita uma cinética de revelação a partir de 15 minutos após a adição do substrato, com intervalos de 15 minutos até 45 minutos, quando a reação era interrompida pela adição de NaOH 2N (50 μ L/poço). Nesta etapa, os soros foram testados nas diluições de 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200.

A densidade óptica foi determinada em 405nm. Para a comparação de ambos os protocolos de ELISA-PPA, o ponto de corte do ensaio original foi mantido ($DO = 0,350$). E para comparação dos resultados obtidos em dias diferentes e em placas diversas, os resultados finais foram expressos na proporção S/P: divisão do valor médio da DO de uma amostra de soro (S) pelo valor médio da DO do soro controle positivo (P). Os soros foram classificados como reativos quando a S/P era maior ou igual do que 0,35, o mesmo valor de ponto de corte utilizado anteriormente pelo ELISA-PPA, que foi otimizado neste estudo. Esta medida foi adotada para que fosse plausível a comparação entre os dois testes.

III.3.1.4. Avaliação do desempenho do ELISA-PPA otimizado

Com o objetivo de comparar o desempenho e reprodutibilidade do protocolo do ELISA-PPA otimizado, todos os 106 soros supra citados foram também testados por um ELISA comercial (ELISA-Pourquier), desenvolvido e gentilmente cedido pelo Instituto Pourquier (França). O teste foi executado e seus resultados interpretados de

acordo com as instruções do fabricante. Tais resultados foram então comparados aos resultados obtidos nestas amostras quando testadas pelo ELISA-PPA otimizado.

III.3.2. Detecção de anticorpos anti-*M. bovis* em testes sorológicos de paratuberculose:

III.3.2.1. Amostras Utilizadas:

Foram utilizados 97 soros provenientes de animais adultos, de cinco diferentes rebanhos com história de tuberculose, mas sem nenhum histórico ou sintomatologia de paratuberculose. Os soros foram coletados de animais abatidos por terem reagido à tuberculinização. Este teste consiste na injeção de 0,1mL de PPD bovina (*M. bovis* cepa AN5, 1mg proteína/mL), correspondente a 5000 unidades internacionais (UI) por dose. Após 72 horas, faz-se a leitura da reação no sítio de inoculação do PPD. A interpretação dos resultados é feita de acordo com as normas do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, que recomenda que um animal seja considerado reativo quando há um inchaço de 4,0mm no local de inoculação. Todos os animais reativos devem ser abatidos.

De cada animal abatido, foram também coletados fragmentos de tecido para posterior caracterização histopatológica das lesões sugestivas e visualização de bacilos álcool ácido resistentes pelo método de coloração de Ziehl-Neelsen. Um soro proveniente de um animal com paratuberculose confirmada por cultura e que vivia em uma área livre de tuberculose foi utilizado como controle.

III.3.2.2. Ensaio Sorológicos Utilizados Nesta Etapa:

Nesta etapa, o estudo foi conduzido em duas fases. Na primeira, as amostras foram testadas pelo protocolo modificado do ELISA-PPA, conforme descrito na etapa anterior, com a única modificação que os soros foram testados em duplicata na diluição de 1:100. Na segunda fase, vinte soros que apresentaram reação sorológica

muito intensa ao ELISA-PPA foram escolhidos para serem analisados por *Western blot*.

Para confirmar os resultados de sororeatividade frente ao ELISA-PPA, os soros reativos foram também testados pelo ELISA comercial (ELISA-Pourquier), desenvolvido na Europa, onde a incidência de tuberculose bovina é baixa (Lilenbaum, 2000). As amostras foram testadas conforme as recomendações do fabricante (Instituto Pourquier, França).

- **Descrição do SDS-PAGE**

A eletroforese foi feita em sistema SDS-PAGE, pelo método vertical com placas de 10x8cm (Bio-Rad Laboratories, USA), com gel de empilhamento de 4% e um gel de separação a 12%, sob corrente constante de 135V, 120mA e 3W durante 90 minutos. As corridas foram testadas com diferentes quantidades de PPA, até chegar-se a 20 μ g, que pareceram ideais pela nitidez e total transferência para a membrana de nitrocelulose, utilizada posteriormente na análise de *Western blot*. Como padrão, utilizou-se padrão pré-corado proteico, com marca de pesos moleculares entre 17 e 245kDa (Roti[®]-Mark prestained, Roth, Alemanha). A coloração dos géis para visualização da qualidade da transferência foi feita pelo corante Azul brilhante de Comassie, em temperatura ambiente durante 18 horas, após sua utilização na etapa de transferência, descrita a seguir.

- **Descrição do *Western blot*:**

Vinte microgramas de PPA foram aplicados em um gel de 12% de poliacrilamida SDS-PAGE para separação de seus componentes proteicos, que foram então eletrotransferidos para uma membrana de nitrocelulose, utilizando o sistema Mini-Protean II[®] (Bio-Rad Laboratories, USA), de acordo com as

instruções do fabricante. Os géis foram corados pelo Azul de Comassie durante a noite, em temperatura ambiente, enquanto as membranas o foram pelo Vermelho de Ponceau durante 10 minutos para visualização das bandas transferidas. Uma vez visualizadas, as membranas eram lavadas com água deionizada e em seguida, bloqueadas. As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com caseína (Sigma-USA) a 5% em TBST (Tris 10mM, 0,9% NaCl, 0,2% Tween 20) durante 18 horas, a 8°C. Os soros foram misturados em quantidades iguais com extrato de *M. phlei* (5mg/mL) durante 60 minutos, a 37°C e depois incubados durante 18 horas à 8°C. Após a pré-adsorção, as amostras sorológicas foram usadas na diluição de 1:100 e incubadas com a membrana durante uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente. Após três lavagens de cinco minutos com TBST, a membrana foi incubada por uma hora em temperatura ambiente com o anticorpo secundário, IgG bovina conjugada à fosfatase alcalina (Sigma-aldrich laboratories- USA), diluído em 1:5000 em TBST/caseína, Após outros três ciclos de lavagem de cinco minutos com TBST, os imunocomplexos foram revelados com a adição de 4mL de BCIP/NBT (Sigma-aldrich- USA). Após 10 minutos de incubação, a reação foi parada com água destilada.

III.3.3. Antígenos Purificados:

Com o propósito de aumentar a especificidade dos testes ELISA de diagnóstico da paratuberculose, alguns estudos investigaram a utilização de proteínas purificadas, espécie-específicas e com potencial imunogênico para identificação da doença em seus estágios mais precoces. MPB70 e MPB83, proteínas purificadas de cepas virulentas de *M. bovis* (McNab *et al.*, 2001), e AhpC, proteína purificada de Map (Olsen *et al.*, 2001) foram incluídas em

nosso estudo com o propósito de aumentar a especificidade do teste ELISA-PPA para diagnóstico de paratuberculose, por suas capacidades em diferenciar entre estas duas infecções de bovinos: tuberculose e paratuberculose.

III.3.3.1. Amostras Utilizadas:

Nesta etapa, foram utilizadas 71 amostras de soros divididos em dois grupos. No grupo A, foram reunidos 23 amostras de soros de animais infectados por Map, todos os casos confirmados pelos resultados positivos em cultura fecal. Estes animais foram criados em rebanhos livres de tuberculose, com resultados negativos nas tuberculinizações periódicas ao longo de cinco anos. Dentre os 23 animais supra-citados, seis apresentavam sintomatologia clínica de paratuberculose e os outros 17 apresentavam infecção subclínica. O grupo B foi composto por 48 soros de animais reativos à tuberculinização, cujo diagnóstico de infecção tuberculosa foi confirmada pelo isolamento de *M. bovis* a partir de tecidos lesionados, coletados após o abate desses animais. Estes animais eram provenientes de rebanhos sem histórico ou sinais clínicos sugestivos de paratuberculose, localizados em regiões onde a infecção jamais havia sido noticiada. Dois soros originados de animais provenientes de rebanhos livres tanto de tuberculose quanto de paratuberculose foram utilizados como controles negativos.

III. 3.3.2. Ensaio ELISA- MPB70/MPB83:

MPB70 e MPB83 foram purificadas e gentilmente cedidas pelo professor John M. Pollock e equipe (Departamento de Agricultura e Desenvolvimento Rural, Irlanda do Norte, Reino Unido). Cada antígeno foi utilizado separadamente como antígeno de captura na concentração de 1µg/mL diluído em tampão carbonato (0,05M; pH 9,8). O antígeno foi adsorvido a uma placa ELISA de 96 poços (Nunc

maxisorb[®], USA) durante 18 horas, à temperatura de 8°C. Após seis lavagens com TBST (TrisHCL 10mM, 0,9% NaCl, 0,2% Tween 20; pH 7,5), a placa foi bloqueada com caseína (Sigma, USA) 2% diluída em TBST durante uma hora, à temperatura ambiente, sob constante agitação. A placa foi lavada mais uma vez e os soros distribuídos em duplicata, na concentração de 1:100, diluídos em TBST com caseína 1%. A incubação ocorreu durante uma hora, sob constante agitação, a 37°C. Como anticorpo secundário, foi utilizado IgG bovina conjugada à fosfatase alcalina, na diluição de 1:5000 e a reação revelada com solução P-Npp em tampão de dietalonamina (pH 9,8) (1mg/mL). Após trinta minutos em caixa escura, a reação foi interrompida com NaOH 2N. O ponto de corte foi determinado através de análise ROC (*analyse-it[®] statistics program*- www.analyse-it.com) por comparação com os resultados de isolamento de *M. bovis*, o que determinou o valor de DO = 0,06 como o mais adequado para ambos os antígenos.

IV. RESULTADOS

IV.1. ETAPA DE OTIMIZAÇÃO

IV.1.1. Modificações do Protocolo original do ELISA-PPA

O antigo protocolo do teste ELISA desenvolvido anteriormente no laboratório (Ferreira, Fonseca & Lilenbaum, et al., 2002) apresentava uma grande variação entre poços dentro de uma mesma placa, além de variação de alguns resultados quando um mesmo soro era testado em diferentes placas. Percebíamos também a presença de efeito “gancho” nos soros mais reativos, onde as amostras mais diluídas (1:400) apresentavam leituras de DO mais altas do que as leituras da mesma amostra em diluições menores (1:100).

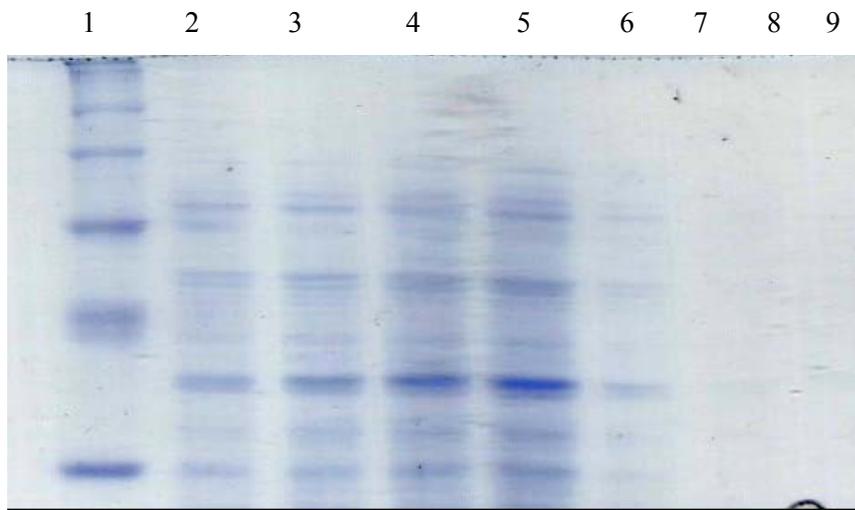
Com o objetivo de otimizar e padronizar o protocolo, soros controles reativos e não reativos foram testados em diferentes condições.

A) Etapa de sensibilização:

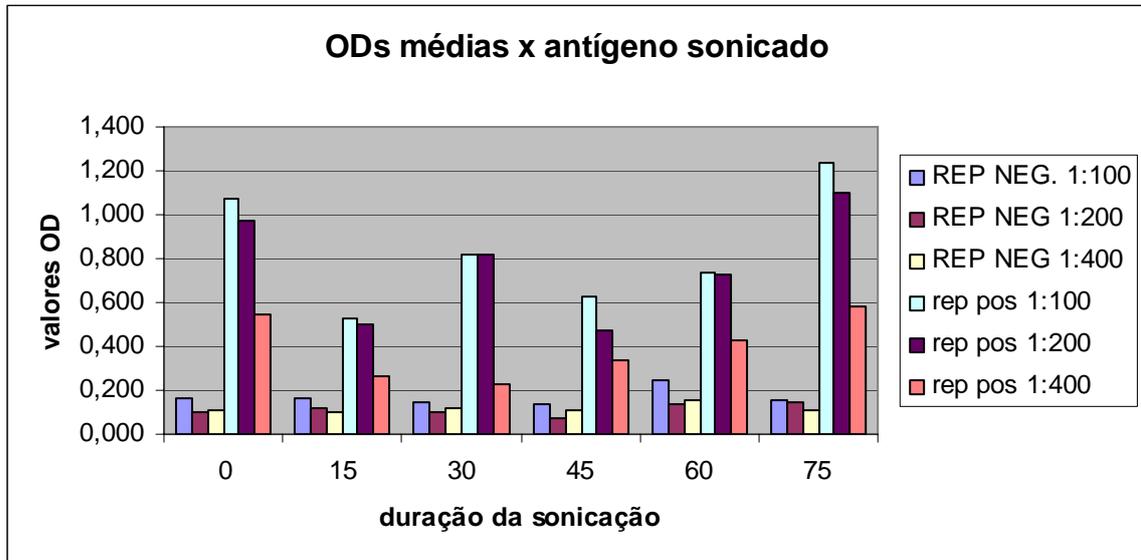
A primeira modificação foi a substituição da solução tampão (TBST composto por 20mM Tris, 3% NaCl, 0,2% de Tween20 em 1L de água destilada), para uma outra com índices de menor salinidade (10mM Tris, 0,9% NaCl e 0,2% de Tween20 em 1L de água destilada). Este tampão foi utilizado para as etapas de lavagem do ELISA e para as diluições das amostras de soro a serem testadas.

Foram instituídas modificações na etapa de sensibilização relativas ao tempo de incubação e tampão utilizado. Desta forma, o antígeno PPA foi previamente sonificado em solução feita com tampão carbonato ou TBS, ambos em pH alcalino (9,4 a 9,8) sob temperatura de 8°C, durante 18 horas ou 37°C, durante 2 horas. A análise de SDS-PAGE demonstrou que em tampão alcalino o composto antigênico PPA não se degradava. Desta forma, o tampão continuou a ser utilizado para a diluição de PPA na etapa de sensibilização do teste (figura 1).

Com o propósito de aumentar a exposição de epítomos de PPA e tornar a solução de PPA mais homogênea, o antígeno foi sonicado em intervalos de 15 segundos até 75 segundos e os tempos de sensibilização modificados. Desta forma, a placa era sensibilizada durante duas horas a 37°C, ou durante 18 horas a 8°C. Embora estatisticamente não houvesse diferenças significativas entre os tempos de sonicação em relação aos valores médios das leituras de DOs das amostras, a partir de 60 segundos de sonicação, houve uma diminuição da variação entre diferentes poços de um mesmo soro, enquanto as duas condições de sensibilização propostas demonstraram resultados satisfatórios e similares. Assim, pelos resultados mais homogêneos obtidos, o antígeno PPA sonicado durante 60 segundos foi diluído no tampão carbonato (pH 9,6) para ser adsorvido à placa durante 18 horas (*overnight*) a 8°C. (Gráfico 1; tabelas 1 e 2).

FIGURA 1: SDS-PAGE do Antígeno PPA.

(*Slots 2-6: PPA (10mg/mL) em tampão carbonato pH9,6 / Slots 7-9: PPA em PBS pH 9,6/ Slot 1: padrão de peso molecular. PPA foi distribuído em cada slot nas seguintes quantidades: 5 μ L, 10 μ L, 15 μ L e 20 μ L).*

GRÁFICO 1: Antígeno sonicado frente a soros controles positivos e negativos

(PPA sonicado em diferentes tempos e testado frente a um soro controle reativo e um soro controle negativo nas diluições de 1:100, 1:200 e 1:400. REP NEG: soro controle negativo/ rep pos: soro controle positivo)

TABELAS 1 e 2: Análise estatística dos valores médios das *DOs* das amostras sorológicas obtidas com PPA sonicado

TABELA 1:

Tempos de Sonicação	15''	60''
Controle negativo	0,032	0,045
Controle positivo	0,261	0,351

(Comparação entre as *DOs* médias dos soros controles obtidas com PPA sonicado durante 15 e 60 segundos. Graus de liberdade = 1. $\chi^2 = 3.31626325254384e-05$ $P < 1$; distribuição não significativa. Soro testado na diluição de 1:100)

TABELA 2:

	Sem sonicação	60''
Controle positivo	0,531	0,351

(Comparação entre *DOs* do soro controle positivo frente ao antígeno PPA sem sonicação e após 60 segundos. Graus de liberdade = 0/ $\chi^2 = 0/$ $p < 1$. Não há diferença significativa entre os resultados. Soro testado na diluição de 1:100)

B) Etapa de pré-adsorção

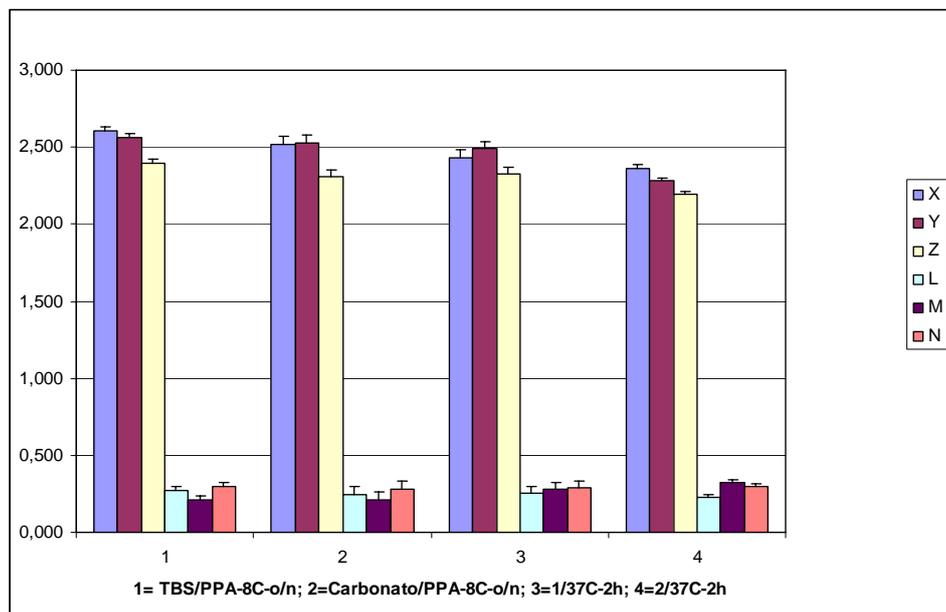
A etapa de pré-adsorção com *M. phlei* foi testada de maneiras distintas: a solução de soro suspeito e *M. phlei*, ambas nas mesmas proporções, sofria agitação intermitente durante uma hora a 37°C. Após esta etapa a solução seria centrifugada durante três minutos a 2000 rpm, ou ficaria incubada durante 18 horas a 8°C. Os soros eram sempre testados nas diluições de 1:100, 1:200 e 1:400, em duplicata ou triplicata. *M. phlei* foi utilizado na concentração de 5mg/mL, conforme sugerida pelo fabricante.

As leituras de DOs dos soros controles negativos foram menores quanto maior foi o tempo de contato entre a amostra e *M. phlei*. Entre os soros controle positivos, embora o mesmo fenômeno tenha sido observado, os valores de DOs permaneceram elevados independente do tempo de incubação com *M. phlei*; portanto, o tempo maior de incubação não foi suficiente para interferir na reatividade do soro controle reativo.

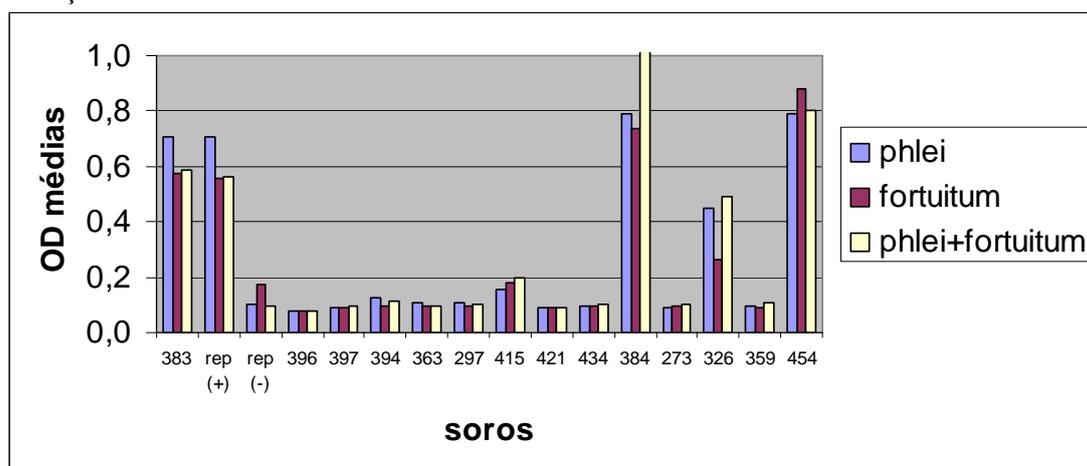
A etapa de pré-adsorção dos soros com extrato de *M. phlei* diminui a ocorrência de reações cruzadas com micobactérias ambientais, o que aumenta a especificidade do teste. A constante agitação a 37°C pode ter facilitado a interação entre antígenos e anticorpos contra micobactérias ambientais, que poderiam estar presentes nas amostras, contribuindo assim para aumentar a especificidade deste ensaio.

Uma vez definidas as condições de pré-adsorção, com o objetivo de tornar o teste mais adaptado às condições do rebanho nacional, tentou-se a utilização de *M. fortuitum*, micobactéria ambiental e de maior ocorrência no Brasil. Sendo assim, *M. fortuitum* foi utilizado na mesma concentração que *M. phlei*, e sob as mesmas condições de pré-adsorção. Em análise de SDS-PAGE, *M. phlei* e *M. fortuitum* foram

testados em condições iguais e apresentaram um padrão de separação de seus componentes proteicos similar, o que sugere a possibilidade de compartilhamento antigênico devido às suas composições protéicas (Figura 2). Os soros controle positivo e negativo e soros de animais com resultados de cultura positivos foram testados em três diferentes condições de pré-adsorção: com *M. phlei*, com *M. fortuitum*, ou com uma mistura de ambos os antígenos em quantidades iguais, num total de 5mg/mL. Alguns soros apresentaram leituras de *DOs* menores quando pré-adsorvidos por *M. fortuitum*, enquanto alguns soros provenientes de animais com resultados de cultura positivos apresentaram leituras de *DOs* mais altas quando a pré-adsorção foi feita com a mistura de ambos os antígenos. Apesar destes achados, não houve diferença significativa nas leituras das *DOs* independentemente do antígeno utilizado, pois mesmo com a diminuição dos valores de *DOs* encontrados, estes ainda permaneceram muito altos (média = 0.650), enquanto os soros controle negativos apresentavam leituras médias de 0,150 (Gráficos 2 e 3).

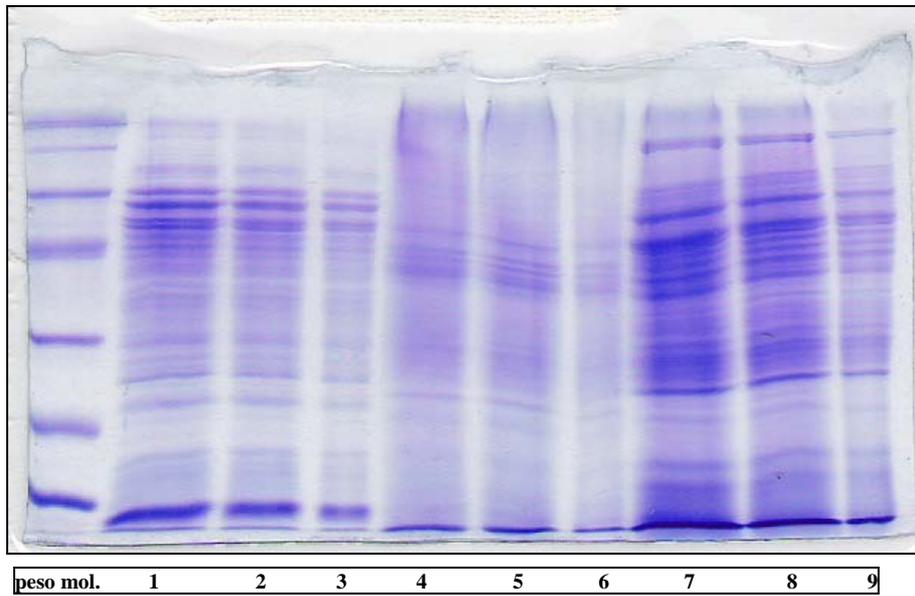
GRÁFICO 2: Experimentos de pré-adsorção

(Experimentos de pré-adsorção em diferentes tempos e condições de sensibilização da placa com antígeno PPA em diferentes tampões. Soros: X= controle positivo com *M. phlei* comercial Paracheck/ Y= controle positivo + *M. phlei* (Allied) durante 18 horas/ Z= controle positivo + *M. phlei* (Allied) durante uma hora/ L= controle negativo + *M. phlei* comercial Paracheck / M= controle negativo + *M. phlei* (Allied) durante 18 horas/ N= controle negativo + *M. phlei* (Allied) durante uma hora.)

GRÁFICO 3: Comparação entre diferentes antígenos para utilização na etapa de pré-adsorção

(Soros de animais classificados como positivos e negativos para paratuberculose de acordo com resultado de cultura. Os soros foram pré-adsorvidos com *M. phlei*, ou *M. fortuitum*, ou uma solução contendo ambos os antígenos. Numeração do eixo x = amostras sorológicas. Amostras sorológicas provenientes de animais com cultura fecal positiva: 383, rep(+), 384, 326, 359, 454).

FIGURA 2: Análise SDS-PAGE de composição protéica de *M. phlei* e *M. fortuitum*

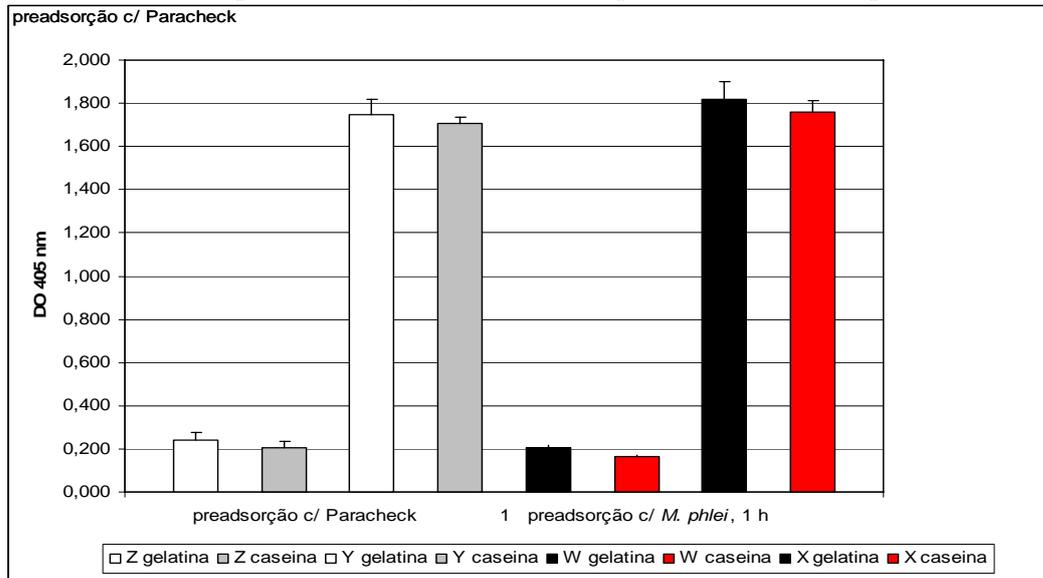


(SDS-PAGE de *M. phlei* e *M. fortuitum* para utilização como antígenos na etapa de pré-adsorção:
Slots 1-3: BCG em 2,4,8 μ g. Slots 4-6: *M. phlei* 2,4,8 μ g/ Slots 7-9: *M. fortuitum* em 2,4,8 μ g).

C) Etapas de Bloqueio:

As soluções de bloqueio são feitas com proteínas inespecíficas, para que não haja adsorção e reação de antígenos com o material utilizado para a manufatura da placa de ELISA. Uma vez que havia uma grande disponibilidade de caseína em nosso laboratório, seu desempenho como proteína de bloqueio foi comparado ao da gelatina, utilizada no antigo protocolo ELISA-PPA, com bons resultados.

Dois soros, sendo um controle positivo e um controle negativo, foram utilizados em toda a placa após pré-adsorção com *M. phlei* durante uma hora. Não houve nenhuma diferença importante entre os valores de DO e os resultados foram bastante homogêneos entre os diferentes poços onde foi aplicada uma mesma amostra sorológica (Gráfico 4).

GRÁFICO 4: Comparação entre gelatina e caseína para utilização como proteína de bloqueio

(Soro controle positivo e soro controle negativo, pré-adsorvidos com *M. phlei* comercial (Paracheck e Allied), diluídos em solução com gelatina ou caseína durante 60 minutos).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)