

ISABEL AZEVEDO CARVALHO

**ISOLAMENTO E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Mycobacterium avium*
subespécie *paratuberculosis* (MAP) EM REBANHOS BOVINOS
LEITEIROS NA REGIÃO DE VIÇOSA - MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C331i
2008

Carvalho, Isabel Azevedo, 1983-

Isolamento e detecção molecular de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) em rebanhos bovinos leiteiros na região de Viçosa - MG / Isabel Azevedo Carvalho. – Viçosa, MG, 2008.
xvi, 55f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 43-51.

1. Bovinos - Doenças. 2. Paratuberculose. 3. Bactérias gram-positivas. 4. *Mycobacterium paratuberculosis*. 5. Veterinária - Diagnóstico. 6. Leite - Microbiologia. 7. Reação em cadeia de polimerase. 8. Zoonoses.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.208969294

ISABEL AZEVEDO CARVALHO

**ISOLAMENTO E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Mycobacterium avium*
subespécie *paratuberculosis* (MAP) EM REBANHOS BOVINOS
LEITEIROS NA REGIÃO DE VIÇOSA - MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 22 de julho de 2008.

Prof. Marcos Jose Pereira Gomes

Prof. Luis Augusto Nero

Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto

Dr.^a Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Prof.^a Paula Dias Bevilacqua
Presidente da Banca

***Aos meus pais, Nélia e Belmiro,
por acreditarem e tornarem esse sonho possível...***

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a luz que ilumina meu caminho.

Aos meus pais, por serem meu porto seguro, uma fonte inesgotável de amor e incentivo e pelo apoio financeiro; vocês são imprescindíveis!

À Isaura, por sempre me mostrar que tudo na vida tem um lado bom e por seus deliciosos quitutes no período de escrita e revisão final desse trabalho.

À Professora Cida, pela orientação, paciência, exemplo, pelos puxões de orelha muitas vezes necessários, por ter lido essa dissertação do início ao fim milhares de vezes sugerindo valiosíssimas alterações, e por ter se tornado mais que minha orientadora, mas minha amiga.

Aos estagiários e amigos Vinicius, Iana, Larissa, Newton, João Carlos e Fernandes, pela dedicação e pelo alegre e enriquecedor convívio, seja no laboratório, nos dias de campo, na direção perigosa pra chegar às fazendas e nos infindáveis *happy hours* regados a piadinhas!

À Professora Célia Moraes, à Professora Márcia Rogéria e ao Professor Patarroyo, por terem gentilmente aberto as portas de seus laboratórios no BIOAGRO para que eu realizasse parte dos experimentos.

Ao Professor Marcos, por ter me recebido de braços abertos na UFRGS, por ter oferecido seu laboratório para que eu pudesse aprender, pela hospedagem em Porto Alegre, pelos vários conselhos durante a realização do estudo, pelas referências bibliográficas imprescindíveis e por ter cedido um isolado de MAP para ser utilizado como controle; e aos seus estudantes de iniciação científica, Gustavo, Bernardo e Gregory, pela troca de experiências no laboratório e pelos bons momentos na capital gaúcha.

Ao Professor Abelardo, pela amizade, por todo o auxílio, incentivo, sugestões e trocas de idéias na realização da parte molecular da pesquisa, pelos demorados momentos em frente ao computador para a análise das seqüências genéticas e por suas sugestões ao ler a dissertação.

À Dr.^a Andrea Alencar, do LANAGRO, por ter cedido um isolado de MAP para ser utilizado como controle.

Ao Professor Nero e à Professora Paula, pelo auxílio, sugestões e por todo o apoio durante a ausência da Professora Cida.

Ao Professor Dantas e ao Professor Pacífico, do setor de Clínica e Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário da UFV pelo direcionamento aos possíveis casos clínicos de paratuberculose.

Aos funcionários do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da UFV, principalmente ao Luiz Carlos, por toda disposição em todos os momentos em que precisei.

Ao Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira e aos proprietários das fazendas, por disponibilizarem seus animais para a coleta de material para a realização da pesquisa; e a todos os estagiários do Programa pela disposição e auxílio nos dias de campo.

A toda a minha família, em especial à Tia Ana e Madrinha Nice, pela torcida e incentivo e à Álida e Jeani por me lembrarem como é bom voltar a ser criança.

À Vavá, Natália, Kaki, Ronaldo, Aline e Ju, pelos inesquecíveis momentos DeSCoNTrOLaDoS, pra sempre eternizados em minha memória.

À Cris, Dudu, Su, Ana, Deisy e Carla, pela agradável convivência, pelos concorridos almoços de domingo, pelos vários momentos de conversa fiada relaxante, enfim, por terem cruzado meu caminho e nele permanecido; vocês foram fundamentais para essa conquista.

Ao Roque, por ser sempre tão prestativo... carro emprestado pra ir às fazendas, motorista pra cima e pra baixo e ainda por cima *office-boy* para impressão e entrega da dissertação para a banca!

Ao Marcos, pelo carinho e pensamento positivo na reta final.

Ao Ronaldo, pelo *abstract*, pelos *helps* e pelas traduções via MSN até bem tarde da noite... *Thank you!*

À Rosi, pelo apoio burocrático durante todo o curso de mestrado, principalmente no período próximo à defesa.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Veterinária e ao BIOAGRO pela oportunidade profissional.

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica – NAGE, da Universidade Federal de Minas Gerais pelo seqüenciamento das amostras.

E a todos os que contribuíram com seus conhecimentos e experiências para a realização desse sonho.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Isabel Azevedo Carvalho, filha de Belmiro de Carvalho Lage Filho e Maria Nélia Azevedo Carvalho, nasceu em 03 de maio de 1983, na cidade de Ipatinga, MG.

Em março de 2001, iniciou o curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, MG, finalizando-o em maio de 2006.

Em outubro de 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, nível de mestrado, sob orientação da Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, concluindo-o em dezembro de 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 – Amostragem	12
3.2 – Coleta das amostras	13
3.3 – Preparo do meio <i>Herrold Egg Yolk Medium</i> (HEYM)	14
3.4 – Processamento das amostras de fezes	15
3.5 – Processamento das amostras de leite	15
3.6 – Cultivo de <i>Mycobacterium avium</i> subesp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	16
3.7 – Extração de DNA e Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	17
3.8 – <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA)	19
3.9 – Clonagem, seqüenciamento e análise genética	19
3.10 – Limite de detecção da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
Caso Clínico I	22
Caso Clínico II	24
4.1 – Cultivo de <i>Mycobacterium avium</i> subesp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	25
4.2 – Extração de DNA e Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	27
4.3 – <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA)	31

4.4 – Clonagem, seqüenciamento e análise genética	32
4.5 – Limite de detecção da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	38
4.6 – Levantamento sobre a paratuberculose na região de Viçosa - MG	40
5. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
APÊNDICES.....	52
Apêndice I – Preparo do meio <i>Herrold Egg Yolk Medium</i> (HEYM)	53
Apêndice II – Agrupamento dos resultados obtidos no presente estudo	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esfregaço de <i>Mycobacterium avium</i> subesp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) corado por Ziehl-Neelsen observado ao microscópio óptico (1000x).....	4
Figura 2.	Mucosa intestinal espessada com dobras transversais evidentes, oriunda de um animal com sinais clínicos da doença	7
Figura 3.	Animal 1 atendido pelo HOV/UFV, apresentando mau estado físico geral e sinais clínicos característicos de paratuberculose.....	23
Figura 4.	Culturas de amostra de leite em tubos de meio HEYM com e sem <i>Micobactina J</i> e esfregaço de colônia corado por Ziehl-Neelsen (1000x).	23
Figura 5.	Animal 2, em uma das propriedades do estudo, apresentado mau estado físico geral e sinais clínicos característicos de paratuberculose	24
Figura 6.	Produtos de PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos BN1/BN2, evidenciados por eletroforese em gel de agarose 1%.....	25
Figura 7.	Comparação dos produtos de PCR utilizando-se os pares de oligonucleotídeos BN1/BN2 e F/B2 evidenciados por eletroforese em gel de agarose 1%	29
Figura 8.	Ensaio de restrição com a enzima <i>EcoRI</i>	32
Figura 9.	Parte do alinhamento genético entre os 626 nucleotídeos dos fragmentos de DNA seqüenciados e seqüências já existentes no <i>Genbank</i>	37
Figura 10.	Agrupamento genético entre as seqüências de MAP descritas no presente estudo e seqüências disponíveis no <i>Genbank</i>	38
Figura 11.	Limite de detecção da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Comparações entre as seqüências de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) obtidas no presente estudo e seqüências de MAP depositadas no *Genbank*.....34
- Tabela 2: Comparações entre as seqüências de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) obtidas no presente estudo e seqüências de *Mycobacterium avium* depositadas no *Genbank*.....36
- Tabela 3: Comparações entre as seqüências de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) obtidas no presente estudo e as seqüências AF455252.1 (*Mycobacterium* sp.) e AY707080.1 (*Streptomyces turgidiscabies*) depositadas no *Genbank*.....36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Localização das propriedades incluídas no estudo, número de vacas totais e em lactação por propriedade e porcentagem e número de animais selecionados em cada propriedade para compor a amostra.....	13
Quadro 2. Seqüências dos dois conjuntos de oligonucleotídeos utilizados para a realização da técnica de PCR	18
Quadro 3. Programas de PCR utilizados e tamanhos dos fragmentos amplificados em cada um deles	18
Quadro 4. Reagentes utilizados na preparação de cada litro de meio HEYM.....	53
Quadro 5. Agrupamento dos resultados obtidos no presente estudo, para melhor visualização.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAAR – bacilos álcool-ácido resistentes
BIOAGRO – Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária
°C – graus Celsius
DNA – ácido desoxirribonucléico
DO – densidade óptica
ELISA – *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*
g – grama
g – aceleração da gravidade
HEYM – *Herrold Egg Yolk Medium*
HPC – cloreto de hexadecilpiridínio
IS – sequência de inserção
L – litro
LABACVET – Laboratório de Bacteriologia Veterinária
LB – Luria-bertani
LDBAC – Laboratório de Doenças Bacterianas
LIMA – Laboratório de Infectologia Molecular Animal
MAP – *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*
MG – Minas Gerais
MIND – Laboratório de Microbiologia Industrial
mg - miligramas
mL – mililitros
μL – microlitros
NAGE - Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica
ng – nanogramas
nm – nanômetros

OIE – Organização Mundial da Saúde Animal
pb – pares de bases
PBS – tampão salina fosfato
PCR – Reação da Polimerase em Cadeia
PDPL – Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira
pH – potencial hidrogeniônico
rpm – rotações por minuto
subesp. – subespécie
TBE – tris borato EDTA
UFC – unidade formadora de colônia
UFV – Universidade Federal de Viçosa
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV – ultravioleta
ZN – Ziehl-Neelsen

RESUMO

CARVALHO, Isabel Azevedo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2008. **Isolamento e detecção molecular de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) em rebanhos bovinos leiteiros na região de Viçosa - MG.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-Orientadoras: Paula Dias Bevilacqua e Célia Alencar de Moraes.

A paratuberculose é uma enterite infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP), que acomete todos os ruminantes, caracterizada por síndrome de má absorção, diarreia e perda de peso. A doença tem grande importância econômica pela redução na produtividade, descarte prematuro de animais e aumento dos custos sanitários. A doença também tem importância em Saúde Pública pela possibilidade do agente etiológico estar ligado à Doença de Crohn em humanos e o principal veículo de transmissão seria o leite. No Brasil, há poucos grupos de pesquisa sobre o assunto e o impacto econômico da doença ainda não foi mensurado. Este estudo propôs avaliar o limite de detecção da técnica de PCR para detecção de MAP em amostras de leite *in natura* e iniciar um levantamento da doença nos rebanhos bovinos leiteiros da região de Viçosa. Foram avaliadas 204 amostras de fezes e 220 amostras de leite individual e de tanque. Observou-se contaminação em 334 (41%) amostras de fezes e 132 (15%) amostras de leite. Não foram observadas colônias com características morfo-tinturiais de MAP após processamento das amostras de fezes avaliadas, e foram observadas colônias somente em meio HEYM com Micobactina J a partir de amostra de leite de um animal com sinais clínicos semelhantes aos da paratuberculose. Foi preparado esfregaço de umas dessas colônias e, ao microscópio óptico, foram constatados BAAR. As 220 amostras de leite foram submetidas à PCR, com dois pares de oligonucleotídeos: IS900BN1/IS900BN2 e ISMav2F/ISMav2B2. Utilizando-se o primeiro par, 8 amostras (3,6%), das quais duas eram de animais com sinais clínicos

semelhantes aos da doença, amplificaram fragmentos de tamanho esperado, de 626pb, e utilizando-se o segundo par, 5 amostras (2,2%) amplificaram fragmentos de tamanho esperado, de 494pb. Amostras de soro e de leite dos 8 animais que amplificaram fragmentos de tamanho esperado utilizando-se o par de oligonucleotídeos com base na seqüência de inserção IS900 foram submetidas ao ELISA. No ELISA do soro, duas amostras (25%) foram consideradas positivas e uma (12,5%), proveniente do animal com sinais clínicos semelhantes aos da doença, foi considerada suspeita; enquanto no ELISA do leite, todas as amostras foram consideradas negativas. As 8 amostras foram clonadas e seqüenciadas. Dessas, 3 (37,5%) foram seqüenciadas com sucesso e a análise genética revelou 99% de identidades entre as seqüências obtidas nesse estudo e a seqüência IS900 depositada no *Genbank*. Por meio de diluições seriadas do DNA plasmidial extraído do clone do controle positivo, foi avaliado o limite de detecção da técnica de PCR para detecção de MAP em amostras individuais de leite bovino *in natura* e foi encontrado que o limite mínimo de detecção foi de, aproximadamente, 140 a 180UFC/mL de leite. O presente estudo produziu a primeira detecção de MAP em amostras de leite no Brasil. Utilizando-se como ferramenta diagnóstica a técnica de PCR IS900, a ocorrência estimada de paratuberculose nos rebanhos bovinos leiteiros avaliados na região de Viçosa, MG foi de 3,6%, fornecendo um primeiro levantamento sobre a doença na região de Viçosa e no estado de Minas Gerais.

ABSTRACT

CARVALHO, Isabel Azevedo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008.
Isolation and molecular detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in dairy cattle in the region of Viçosa - MG, Brazil.
Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-Advisers: Paula Dias Bevilacqua and Célia Alencar de Moraes.

Paratuberculosis is a chronic infectious enteric disease caused by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* that affects all ruminants, characterized by malabsorption, diarrhea, and weight loss. The disease has a great economic importance due to the milk production decrease, culling of infected cows, and the increase of sanitary costs. The disease has also an importance in Public Health, considering that the etiological agent can be associated with Crohn's Disease in humans and the main transmitting vehicle would be the milk. In Brazil, there are few research groups about the subject and the disease's economic impact was not measured yet. This study aimed at initiating a survey of the disease in dairy herds in the region of Viçosa and evaluating the detection limit of the PCR for the MAP detection in raw milk samples. 204 fecal samples and 220 pooled quarter and bulk tank milk samples were analyzed. It was observed contamination in 334 (41%) fecal samples and in 132 (15%) milk samples. After the faeces samples processing, colonies with morphological and chemical features similar to MAP were not observed, and it was found colonies only in HEYM with Mycobactin J from milk samples of an animal with clinic signals similar to paratuberculosis. A smear was prepared from one of these colonies and, in optic microscope, BAAR was detected. The 220 milk samples went through the PCR, with two pairs of primers: IS900BN1/IS900BN2 e ISMav2F/ISMav2B2. Using the first one, 8 samples (3.6%), of which two were of animals with clinical signals similar to the disease, amplified fragments of expected size (626bp), and using the second pair, 5 samples (2.2%) amplified fragments of

expected size (494bp). Serum and milk samples of 8 animals that amplified fragments of expected size using the pair of primers based on the insertion sequence IS900, were submitted to ELISA. In the serum ELISA, two samples (25%) were considered positive and one (12,5%), proceeding from the animal with clinical signals similar to the disease, was considered suspect; while in the milk ELISA, all the samples were considered negative. The 8 samples were cloned and sequenced. Of these, 3 (37,5%) were sequenced successfully and the genetic analysis revealed 99% of identities among the sequences obtained in this study and the IS900 sequence deposited in the Genbank. Through sequential dilution of the plasmid DNA extracted from the positive control clone, it was evaluated the detection limit of the PCR for the MAP detection in pooled quarter milk samples. It was found that minimum detection limit ranged approximately from 140 to 180CFU/ml of milk. This study reported the first MAP detection in milk samples in Brazil. Using the IS900 PCR as a diagnosis tool, the estimated rate of paratuberculosis in dairy herds evaluated in the region of Viçosa - MG was of 3,6%, providing a first survey about the disease in the region of Viçosa and in Minas Gerais State.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o sexto maior país produtor de leite, com um volume que corresponde a aproximadamente 4,5% da produção mundial. A região Sudeste é a maior região produtora, responsável por 38,4% de toda a produção nacional e Minas Gerais, contribui com 27,9% da produção leiteira do país (Produção da Pecuária Municipal, 2006). Apesar da alta produção, a produtividade dos rebanhos leiteiros no Brasil é baixa, assim como no estado de MG. A cadeia agroindustrial do leite é importante do ponto de vista econômico e social, com geração de renda significativa e empregos em todos os setores.

A paratuberculose, ou Doença de Johne, é uma enterite infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP), que acomete todos os ruminantes, caracterizada por síndrome de má absorção e conseqüente diarreia e perda de peso. A doença tem grande importância econômica pela redução na produtividade dos rebanhos leiteiros, redução nos teores de proteína do leite, descarte prematuro de animais, maior susceptibilidade a outras doenças e aumento dos custos sanitários; porém seu impacto econômico ainda não foi mensurado no Brasil. A doença também tem importância em Saúde Pública pela possibilidade do agente etiológico estar ligado à Doença de Crohn em humanos. Nesse caso, o principal veículo para a transmissão do microrganismo seria o leite cru, e possivelmente, o leite em pó e o leite pasteurizado, uma vez que estudos demonstraram a presença de MAP viável.

A enfermidade é bastante estudada em todo o mundo e estima-se que as perdas econômicas sejam da ordem de 200 a 250 milhões de dólares por ano, somente nos Estados Unidos. No Brasil, entretanto, existe uma carência de estudos sobre a doença e sobre os impactos econômicos causados por ela nos rebanhos brasileiros.

Vários métodos, incluindo cultura, testes imunológicos e lesões histopatológicas têm sido usados para diagnóstico de animais infectados. A cultura fecal é o método considerado “padrão-ouro” para o diagnóstico da doença, entretanto, em função da natureza fastidiosa do agente e de seu crescimento muito lento, o cultivo constitui um procedimento demorado e oneroso. Assim, novos métodos para descontaminação das amostras avaliadas vêm sendo propostos e não existe uma padronização nesse sentido.

A indústria de laticínios brasileira busca novos mercados internacionais e a qualidade higiênico-sanitária do leite constitui uma das barreiras comerciais. Num futuro próximo, a exigência de leite livre de MAP será uma realidade.

Considerando a importância sócio-econômica e em Saúde Pública, a escassez de estudos sobre a doença no Brasil, a falta de uma metodologia padronizada para o diagnóstico da doença e a importância da qualidade do leite, este estudo propôs avaliar o limite de detecção da técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para detecção de MAP em amostras de leite *in natura*, além de iniciar um levantamento da doença nos rebanhos bovinos leiteiros da região de Viçosa, de forma a colaborar na compreensão da epidemiologia da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A paratuberculose ou Doença de Johne é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) caracterizada pela presença de diarreia persistente e perda de peso progressiva (COCITO et al., 1994).

A primeira observação do microrganismo causador dessa doença foi feita em 1895, por Johne e Frothingham, que isolaram uma bactéria álcool-ácido resistente do íleo de animais com uma inflamação granulomatosa crônica (STABEL, 1998). A doença foi denominada paratuberculose, em função da sua semelhança com a tuberculose intestinal. Apesar de a doença ter sido relatada em 1895, a identificação do agente é atribuída a Twort que, em 1910, cultivou pela primeira vez o microrganismo em laboratório (COCITO et al., 1994). A presença de MAP no leite foi demonstrada pela primeira vez em vacas infectadas clinicamente, em 1929, por Alexejeff-Goloff (JAYARAO et al., 2004).

Nos EUA, a paratuberculose bovina é bastante estudada e estima-se que ocorram perdas econômicas para a indústria leiteira da ordem de 200 a 250 milhões de dólares por ano (OTT et al., 1999). Essas perdas devem-se à diminuição da produção, redução nos teores de proteína do leite, descarte prematuro de animais, maior susceptibilidade a outras doenças, redução na fertilidade e aumento dos custos sanitários (STABEL, 1998; JOHNSON et al., 2001; LOSINGER, 2005). No Brasil, os estudos sobre a doença ainda são iniciais e o seu impacto econômico ainda não foi mensurado (GOMES et al., 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a paratuberculose pertence à Lista B de enfermidades, que compreende as doenças transmissíveis de importância sócio-econômica e/ou de importância em Saúde Pública, cujo controle é necessário para o comércio internacional de animais e alimentos de origem animal

(OIE, 2007). A importância da paratuberculose em Saúde Pública deve-se ao seu possível potencial zoonótico na Doença de Crohn em pacientes humanos (HERMON-TAYLOR, 2001).

MAP é um bacilo pequeno, Gram-positivo, intracelular, álcool-ácido resistente, pertencente à Família Mycobacteriaceae, de crescimento lento, e quando observado ao microscópio, geralmente apresenta-se em pequenos aglomerados (Figura 1) (COLLINS, 2003). Como outras micobactérias, possui uma parede celular espessa, composta principalmente por lipídeos (THOREL et al., 1990), o que determina sua propriedade álcool-ácido resistente, hidrofobicidade e alta resistência a processos químicos, como a cloração da água (WHAN et al., 2001) e físicos, como a pasteurização (GRANT et al., 1999).

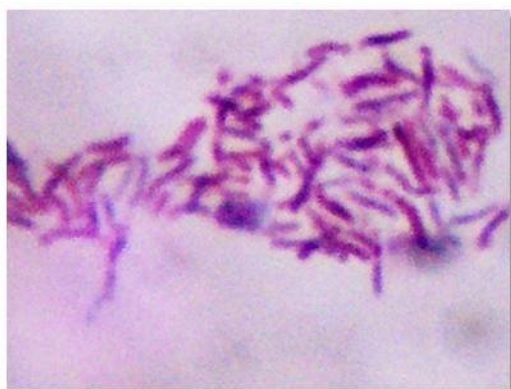


Figura 1. Esfregaço de cultura de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) corado por Ziehl-Neelsen observado ao microscópio óptico (1000x).

A morfologia das colônias de MAP depende do meio utilizado para seu crescimento. Em meio *Herrold Egg Yolk Medium* (HEYM) elas são pequenas, medem aproximadamente 1 a 2mm, são em geral brancas, convexas e lisas, enquanto em agar Middlebrook, elas tornam-se mais rugosas (COLLINS, 2003). Mesmo sob condições ótimas, as colônias podem demorar de 3 a 4 meses, ou mais, para tornarem-se visíveis (COLLINS, 2003). Outras características de MAP, que servem para diferenciá-la de outras bactérias, são sua dependência de Micobactina J para crescimento *in vitro*, um composto extraído de células micobacterianas que auxilia na captação de ferro (LAMBRECHT e COLLINS, 1992) e a presença do elemento de inserção IS900, que aparece como 14 a 18 cópias dentro do seu genoma (GREEN et al., 1989).

O genoma completo de MAP (K-10) foi seqüenciado em janeiro de 2004 por pesquisadores da Universidade de Minnesota. Análises mostraram que MAP K-10 possui uma seqüência circular de 4.829.781 pares de bases, com 69,3% de G + C (LI et al., 2005). Ao compararem o genoma de MAP e de outras micobactérias, LI et al. (2005) sugeriram duas hipóteses para o crescimento extremamente lento de MAP. Na primeira, a presença de uma seqüência de inserção, MAP0028c/IS1311, muito mais próxima ao oriC em MAP comparado ao *M. tuberculosis*, seria prejudicial à replicação cromossômica, o que levaria a um maior intervalo de geração. A segunda teoria seria a presença do gene *map0638* com uma taxa de substituição mais alta quando comparada ao *M. tuberculosis*. Esse gene é responsável pela regulação da síntese de purina e, conseqüentemente, possui uma função na taxa de síntese protéica e crescimento celular (LI et al., 2005).

A doença afeta ruminantes domésticos e silvestres em todo o mundo (NAHMS, 2005). Os dados de prevalência nos diversos países são variáveis, de acordo com a metodologia utilizada; na Europa varia entre 7 e 55%, na Austrália, de 9 a 22% (MANNING e COLLINS, 2001) e estima-se que 68,1% das fazendas leiteiras nos EUA, possuam animais infectados por MAP (NAHMS, 2008).

No Brasil, a primeira notificação da doença, ocorreu no Rio de Janeiro, em um animal importado (DUPONT, 1915). O segundo caso foi relatado somente em 1956, novamente em um animal importado (SANTOS e SILVA, 1956). De 1960 até os dias de hoje, a doença já foi relatada no Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, em animais nascidos e criados no Brasil (DACORSO FILHO et al., 1960; SILVA, 1961; PORTUGAL et al., 1979; RAMOS et al., 1986; NAKAJIMA et al., 1991; POESTER e RAMOS, 1994; DRIEMEIER et al., 1999; GOMES et al., 2002).

Apesar de as pesquisas sobre a paratuberculose no Brasil terem aumentado consideravelmente, os estudos publicados na área ainda são poucos (GOMES et al., 2002). Os estudos publicados sobre a prevalência da doença em diferentes estados são fundamentados em diferentes metodologias e não se têm dados consistentes sobre a prevalência no país. Estudos revelaram uma prevalência de 37,9% no estado de São Paulo (LARANJA-DA-FONSECA et al., 1999), 30% no estado do Rio de Janeiro (RISTOW et al., 2007), 60,24% em Goiânia (ACYPRESTE et al., 2005), 45,51% no Mato Grosso do Sul (RIVERA, 1996) e 44,6% no Rio Grande do Sul

(GOMES et al., 2005). Em Minas Gerais, foi relatado somente um caso (NAKAJIMA et al., 1991) e não existem estudos sobre a prevalência da doença.

Sob condições naturais, geralmente a transmissão do microrganismo é horizontal, pela ingestão de alimento ou de água contaminada com MAP. A transmissão também pode ocorrer por via vertical, por meio da infecção intra-uterina, do colostro de fêmeas infectadas ou de sêmen contaminado (SWEENEY, 1996).

A enfermidade em geral manifesta-se em bovinos adultos jovens. Após o período de incubação, de aproximadamente 2 a 5 anos, ocorre o aparecimento dos sinais clínicos. Entretanto, os animais infectados eliminam o microrganismo nas fezes, e em menor quantidade no leite, mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos, o que contribui para a propagação da doença (LARSEN et al., 1975). O confinamento contribui para a infecção dos animais e pode ser uma das razões para a maior prevalência da doença em rebanhos bovinos de leite quando comparada a rebanhos de corte (MERKAL et al., 1987). O longo período de incubação tem grande importância no impacto econômico causado pela doença, pois, os animais infectados são inaparentemente responsáveis pela disseminação do agente e, conseqüentemente, da doença nos rebanhos (JOHNSON et al., 2001).

O alvo primário de infecção de MAP *in vivo* são as células M das placas de Peyer e as lesões primárias ocorrem nas paredes do intestino delgado e linfonodos mesentéricos. A multiplicação do microrganismo leva à extensão das lesões para o íleo, jejuno, ceco e cólon, interferindo no metabolismo intestinal (CHIODINI et al., 1984). As principais lesões macroscópicas são caracterizadas pelo espessamento da mucosa intestinal, que apresenta aspecto reticulado, com dobras transversais bem evidentes (Figura 2) e aumento de tamanho dos linfonodos mesentéricos. Os principais achados histopatológicos consistem em enterite, linfangite e linfadenite granulomatosas, associados à presença de bacilos álcool-ácido resistentes em macrófagos (DRIEMEIER et al., 1999).

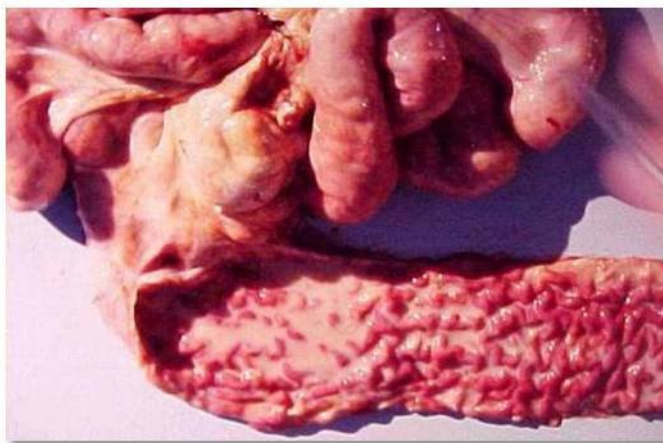


Figura 2. Mucosa intestinal espessada com dobras transversais evidentes, oriunda de um animal com sinais clínicos da doença (Fonte: Driemeier et al., 1999).

Os sinais clínicos típicos da doença são emagrecimento rápido e progressivo e diarreia intermitente, que se torna progressivamente mais grave. Os animais continuam com o apetite normal, mas não conseguem absorver efetivamente os nutrientes. No estágio final, os animais apresentam diarreia crônica não tratável e vão a óbito em estado caquético (COCITO et al., 1994). Durante os primeiros estádios da paratuberculose, a imunidade caracteriza-se por uma forte resposta imune mediada por células, e nos últimos estádios, há uma resposta imune humoral, que pode ser observada, menos freqüentemente, também antes de aparecerem os sinais clínicos. As concentrações de anticorpos tornam-se mais altas com a progressão da doença, quando as lesões tornam-se mais extensas, o que reflete a quantidade de antígeno presente (COCITO et al., 1994).

O agente causador da paratuberculose ainda não é classificado como agente zoonótico, mas tem sido relacionado à Doença de Crohn em humanos, o que leva à especulação sobre o potencial zoonótico do MAP (COLLINS, 1997; FELLER et al., 2007; BEHR e KAPUR, 2008; WADDELL et al., 2008). A Doença de Crohn é uma enterite granulomatosa que acomete o ser humano, muito semelhante à paratuberculose. Os pacientes infectados apresentam diarreia e perda de peso crônicas, com lesões teciduais graves no epitélio intestinal. Pacientes com idades entre 15 e 30 anos são os mais freqüentemente reportados (COTTONE et al., 1995).

Várias teorias sobre a possível etiologia da Doença de Crohn têm sido sugeridas ao longo dos anos, incluindo uma variedade de agentes virais e bacterianos, incluindo MAP, e até mesmo uma origem imunológica. Evidências apontam para uma interação entre um estímulo ambiental persistente, como um

antígeno microbiano, e fatores genéticos que regulam a resposta imunológica ou a função da mucosa intestinal (SHANAHAN e O'MAHONY, 2005). Várias pesquisas buscando uma associação entre MAP e Crohn vêm sendo realizadas (HERMON-TAYLOR, 2001; GRANT, 2005; UZOIGWE et al., 2007). Em estudos recentes, MAP e anticorpos contra o microrganismo já foram detectados a partir de amostras de soro e tecidos de pacientes humanos portadores da Doença de Crohn, por meio de cultura, pela técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e por métodos sorológicos (NASER et al., 2000; BULL et al., 2003; OLSEN et al., 2003; NASER et al., 2004; SECHI et al., 2005). Além dessas evidências, pacientes de Crohn já foram tratados com sucesso utilizando-se drogas contra MAP (HERMON-TAYLOR, 2002; BORODY et al., 2007). No entanto, não é possível concluir que um único agente seja exclusivamente responsável pela causa da Doença de Crohn; uma causa multifatorial é mais provável (HARRIS e LAMMERDING, 2001).

O veículo de transmissão de MAP dos animais para o ser humano seria o leite contaminado (MANNING e COLLINS, 2001). Estudos recentes investigaram o efeito da pasteurização sobre o leite contendo grandes concentrações de MAP. Quase todos relataram sobrevivência de MAP após a pasteurização, embora não exista um consenso sobre que concentrações de MAP presentes no leite cru seriam inativadas pelas atuais condições de pasteurização (CHIODINI e HERMON-TAYLOR, 1993; MILLAR et al., 1996; GRANT et al., 2002; AYELE et al., 2005; ELLINGSON et al., 2005).

Para a implementação de um adequado programa de controle da paratuberculose, é necessária a identificação dos animais infectados, antes que eles comecem a apresentar os sinais clínicos da doença, pois antes dessa fase esses animais já possuem a capacidade de eliminar uma grande quantidade de MAP para o ambiente (COCITO et al., 1994). Porém, os métodos diagnósticos disponíveis atualmente são pouco satisfatórios para a detecção rápida do agente, o que limita o diagnóstico precoce da enfermidade (OIE, 2006; STABEL, 1998).

O diagnóstico da doença pode ser fundamentado na detecção do agente etiológico ou na detecção da resposta imune a esse agente (MANNING e COLLINS, 2001). Vários métodos têm sido utilizados para diagnosticar a doença: cultura fecal, testes imunológicos e testes histopatológicos (GOMES et al., 2002; KHARE et al., 2004; MUNJAL et al., 2007; ROUSSEL et al., 2007).

O isolamento de MAP por meio da cultura fecal é a técnica considerada “padrão-ouro” para o diagnóstico da paratuberculose, apesar de possuir baixa sensibilidade e de necessitar de até 16 semanas para serem observadas as primeiras colônias (CHIODINI et al., 1984). Em função do crescimento lento de MAP, por esse método é difícil detectar os animais infectados nos estádios iniciais da doença (MANNING, 2001). O agente é cultivado em meio específico e a confirmação das colônias é feita por meio da sua dependência à Micobactina J (FRANCIS et al., 1953) ou de provas moleculares tendo como alvo a sequência de inserção IS900, elemento padrão que possibilita a identificação genética de MAP (STEVENSON e SHARP, 1997).

Vários testes sorológicos têm sido utilizados para detecção rápida de animais infectados: fixação do complemento, imunodifusão em agar gel e ELISA. Entretanto, em função da imunidade da doença, mediada por células nos estádios iniciais, e humoral nos últimos estádios, esses testes geralmente apresentam alta sensibilidade em animais infectados que apresentam sinais clínicos, e baixa sensibilidade em animais que não os apresentam. Assim, são mais úteis nos estádios clínicos da doença (COLGROVE et al., 1989; WHITLOCK et al., 2000; TRIPATHI et al., 2006). Dentre os testes sorológicos, o ELISA é o mais comumente utilizado pela sua aceitável sensibilidade e boa especificidade (OIE, 2006). Apesar da baixa sensibilidade e especificidade, também já foram utilizados testes intradérmicos, onde animais infectados evidenciam uma resposta celular quando em contato com proteínas de MAP purificadas (LARSEN e KOPECKY, 1965; KOPECKY e LARSEN, 1975; DE LISLE et al., 1980). Esses testes não são recomendados, pois podem ocorrer reações cruzadas dessas proteínas com a tuberculina, durante a tuberculinização, teste realizado para o diagnóstico da tuberculose, o que pode levar a resultados falso-positivos (COCITO et al., 1994; COLLINS, 2004).

A detecção rápida de microrganismos de crescimento lento vem se tornando possível por meio do emprego de técnicas de biologia molecular (HAWKEY, 1994). O descobrimento da sequência de inserção IS900 no genoma de MAP e o desenvolvimento da PCR revolucionaram essa área (GREEN et al., 1989; STEVENSON e SHARP, 1997).

A técnica de PCR é utilizada com sucesso para detectar DNA de MAP em amostras de leite pasteurizado e leite *in natura* e é mais sensível que a cultura fecal.

Por meio dela é possível detectar concentrações tão baixas quanto 10UFC/mL de leite (PILLAI e JAYARAO, 2002). É uma técnica altamente sensível e específica para a detecção de MAP, além de rápida, que pode diminuir o tempo de diagnóstico de meses para apenas dois dias. Essa técnica é, ainda, bastante versátil, considerando que pode ser utilizada em amostras de fezes, tecidos usados para necropsia, leite, sangue e sêmen (CLARKE, 1997). Apesar de todas essas vantagens, a PCR também possui limitações e problemas, como o excesso de DNA não específico; a presença de substâncias nas amostras, que podem impedir a amplificação; a qualidade da preparação do DNA genômico; a detecção de material genômico e não de células viáveis, entre outros (KHARE et al., 2004). Assim, a padronização da técnica para cada tipo de amostra é fundamental para um diagnóstico confiável.

Não há resultados satisfatórios no tratamento de animais acometidos pelo MAP, sendo indicado o sacrifício destes (NRCNA, 2003). As vacinas atuais existentes contra MAP não protegem completamente os animais e há ainda o problema de reações cruzadas. Animais vacinados podem apresentar resultados positivos no teste da tuberculina, interferindo no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), esta última causada pelo *Mycobacterium bovis*. A vacinação não é, portanto, recomendada (COCITO et al., 1994).

No Brasil, a prevalência estimada da paratuberculose é maior do que em outros países, sendo necessários estudos para se subsidiarem medidas de controle nos rebanhos nacionais, uma vez que, no país, não há programa sanitário para esta doença (GOMES et al., 2002). Como medidas preventivas, podem ser citadas medidas de manejo geral, como a higiene geral das instalações, separação dos animais em lotes por idade, identificação e descarte dos animais infectados (COLLINS, 2004; LU et al., 2008). É consenso entre os pesquisadores que o desenvolvimento de um método de diagnóstico rápido, de alta sensibilidade e especificidade para identificar os animais infectados subcl clinicamente, é essencial para a formulação de programas de controle da paratuberculose (ALVAREZ et al., 2008; CLARK et al., 2008).

Os objetivos do presente estudo foram isolar MAP a partir de amostras de fezes e de leite bovinos, detectar DNA de MAP por meio da técnica de PCR em amostras de leite bovino, agrupar geneticamente as bactérias isoladas, por meio de

clonagem e seqüenciamento dos fragmentos de DNA amplificados e avaliar o limite de detecção da técnica de PCR, para que a mesma possa ser introduzida como um método de rotina para a detecção rápida e eficiente de MAP em amostras de leite bovino *in natura*, além de fazer um primeiro levantamento sobre a doença na região de Viçosa e no estado de Minas Gerais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC) localizado no Departamento de Veterinária (DVT), e nos Laboratórios de Microbiologia Industrial (MIND) e de Infectologia Molecular Animal (LIMA), localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO). Todos os laboratórios pertencem à Universidade Federal de Viçosa (UFV). O seqüenciamento das amostras foi realizado no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e os testes sorológicos das amostras de leite foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LABACVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.1 – Amostragem

A amostragem foi realizada utilizando-se 204 animais de 16 propriedades da região de Viçosa. Foram incluídos no estudo animais de propriedades localizadas próximas à UFV que possuíam tanque de resfriamento de uso único da propriedade, cujos proprietários consentiram o uso de seus animais para realização da pesquisa. Com base no número de animais em lactação, os animais foram selecionados aleatoriamente, em cada propriedade, para compor a amostra (Quadro 1).

Também foram incluídos no estudo um animal cujo proprietário relatou diarreia e emagrecimento no dia da coleta de amostras na propriedade e um animal atendido no Hospital Veterinário da UFV que apresentava esses mesmos sinais, ambos sem causa aparente.

Localização	Vacas totais	Vacas em lactação	Porcentagem amostrada	Amostra
Araponga	60	50	7,1%	15
Cajuri	65	55	7,9	16
Coimbra	105	90	12,8%	26
Coimbra	35	30	4,3%	9
Coimbra	50	35	5%	10
Coimbra	45	40	5,7%	12
Divinésia	60	50	7,1%	15
Ervália	60	40	5,7%	12
Ervália	50	35	5%	10
Paula Cândido	22	18	2,6%	5
Paula Cândido	45	35	5%	10
Paula Cândido	18	15	2,1%	4
Piranga	45	38	5,4%	11
Piranga	100	90	12,8%	26
São Miguel	65	55	7,9%	16
Viçosa	33	25	3,6%	7
Total	858	701	100%	204

Quadro 1. Localização das propriedades incluídas no estudo, número de vacas totais e em lactação por propriedade e porcentagem e número de animais selecionados em cada propriedade para compor a amostra

3.2 – Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de fezes de todos os animais, individualmente, via retal, utilizando-se luvas para procedimento descartáveis e, posteriormente, transferidas para frascos com tampa previamente esterilizados e identificados.

Para a coleta de leite individual, os tetos de todos os 204 animais foram lavados com água corrente e secos com papel toalha embebido em álcool 70%. Os três primeiros jatos de leite foram descartados. Foi coletada uma amostra única por animal, resultante da coleta de aproximadamente 10mL de leite de cada teto, em tubos de polipropileno de 50mL, previamente esterilizados. Da amostra de leite coletada de cada animal, uma alíquota de 1mL foi separada e estocada a -20°C para realização do teste sorológico. De cada propriedade, também foi coletada uma amostra de 1L de leite do tanque de resfriamento, em *erlenmeyer* esterilizado (JAYARAO et al., 2004).

Dos 8 animais positivos para os testes de PCR, foram coletadas amostras de sangue da veia coccígea ventral após assepsia com algodão embebido em álcool 70%. Uma alíquota de, aproximadamente, 3mL foi coletada de cada animal utilizando-se sistema de coleta a vácuo, em tubos de vidro siliconizados sem anticoagulante Vacutainer® (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA).

Todas as amostras foram acondicionadas em caixa de isopor resfriada até a chegada ao LDBAC/DVT/UFV, onde permaneceram resfriadas a 8°C. As amostras de fezes e de leite foram processadas para isolamento dentro de 24 horas após a chegada ao laboratório. As amostras de sangue, ao chegarem ao laboratório, foram centrifugadas a 500 x *g* por 5 minutos e o soro foi transferido para tubos de polipropileno de 1,5mL. As amostras de soro resultantes foram congeladas e enviadas para o Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LABACVET) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde foi realizado o ELISA do soro.

Como controle positivo foi utilizado um isolado de campo, gentilmente cedido pelo LABACVET/UFRGS e como controle negativo foram incubados tubos contendo meio HEYM sem inóculo.

3.3 – Preparo do meio *Herrold Egg Yolk Medium* (HEYM)

Para o preparo do meio *Herrold Egg Yolk Medium* (HEYM) com e sem *Micobactina J* (Allied Monitor, Inc., Fayette, MO, EUA) seguiu-se a metodologia proposta no Capítulo 2.2.6 do Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres, da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), com modificações fundamentadas nos protocolos utilizados pelo LABACVET/UFRGS¹. A *Micobactina J* (Allied Monitor, Inc.) foi adicionada ao meio na concentração de 2mg/L. Os reagentes e o modo de preparo do meio HEYM estão no Apêndice I.

Para cada lote de meio HEYM preparado com e sem *Micobactina J* (Allied Monitor, Inc.), tubos controle positivo e negativo foram incubados a 37°C, para verificação do sucesso no preparo do meio.

¹ Informação pessoal.

3.4 – Processamento das amostras de fezes

Segundo a metodologia descrita por STABEL (1997), foram pesados 2g de fezes e colocados em tubos de vidro esterilizados contendo 20mL de água destilada autoclavada. Posteriormente, os tubos foram submetidos à agitação de 110rpm, por 60 minutos e, em seguida, mantidos em repouso, por 45 minutos, à temperatura ambiente, para sedimentação.

Após a sedimentação, 5mL da parte superior do sobrenadante foram retirados e colocados em tubos de polipropileno de 50mL contendo 20mL de solução de cloreto de hexadecilpiridínio (HPC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 0,9% e mantidos à temperatura ambiente (20-22°C), durante a noite, para descontaminação.

Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1700 x *g*, por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi ressuspenso em 1mL de solução antimicrobiana contendo ácido nalidíxico (50mg/mL) (Alamar Tecnológica Ltda, Diadema, SP, Brasil), cloridrato de vancomicina (50mg/mL) (Laboratório Teuto Brasileiro S/A, São Paulo, SP, Brasil) e anfotericina B (150mg/mL) (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Desta suspensão, 150µL foram inoculados em quatro tubos de meio HEYM inclinado, dois deles contendo Micobactina J (Allied Monitor, Inc.) e dois sem o sideróforo.

O restante da suspensão foi transferido para tubos de polipropileno de 1,5mL que foram mantidos a 8°C, por uma semana, para reinoculação em caso de possíveis contaminações nos tubos com meio de cultura.

3.5 – Processamento das amostras de leite

Segundo metodologia descrita por PILLAI e JAYARAO (2002), 40mL de leite foram centrifugados a 1950 x *g*, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, ao sedimento, foram adicionados 200µL de tampão salina fosfato (PBS), pH 7,2. Em seguida, a suspensão foi dividida em duas partes: a primeira para extração de DNA e PCR e a segunda para cultivo de MAP.

A primeira parte da suspensão foi novamente centrifugada a 1950 x *g*, por 5 minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com 1mL de PBS pH 7,2 centrifugando-se a 1950 x *g*, por 5 minutos em cada lavagem. Em seguida, o sedimento foi

ressuspendido em tubos de polipropileno de 1,5mL previamente autoclavados, contendo 250µL de PBS, pH 7,2 e os tubos foram armazenados a 8°C e reservados para o teste de PCR.

À segunda parte da suspensão, foram adicionados 15mL de HPC (Sigma-Aldrich) 0,9% em tubos de polipropileno de 50mL e deixados por 5h à temperatura ambiente (20-22°C). Após esse período, os tubos foram centrifugados a 1800 x *g*, por 15 minutos, à temperatura ambiente e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspendido em 1mL de solução antimicrobiana contendo ácido nalidíxico (50mg/mL) (Alamar Tecno-Científica Ltda), cloridrato de vancomicina (50mg/mL) (Laboratório Teuto Brasileiro S/A) e anfotericina B (150mg/mL) (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda). Desta suspensão, 150µL foram inoculados em quatro tubos de meio HEYM inclinado, dois deles com Micobactina J (Allied Monitor, Inc.), e dois sem o sideróforo. O restante da suspensão das amostras de leite foi submetido ao mesmo procedimento descrito no processamento das amostras de fezes.

Também foi testado o protocolo de processamento de amostras de leite unindo o sedimento com a camada de gordura, resultantes do processo de centrifugação (SINGH e VIHAN, 2004). Após esta etapa, o procedimento de descontaminação dessas amostras seguiu o mesmo protocolo utilizado para as amostras que não utilizaram gordura no processamento.

3.6 – Cultivo de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP)

Após a descontaminação das amostras de fezes e de leite e inoculação em tubos contendo meio HEYM inclinado, os tubos foram incubados a 37°C, por 18 semanas (KALIS et al., 1999) e observações de crescimento foram feitas semanalmente.

Foram preparados esfregaços em lâminas a partir das amostras de fezes após processamento e a partir das colônias observadas, oriundas de inoculação de amostras de fezes e de leite. As lâminas foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) para verificação da presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), utilizando-se o Conjunto para Coloração Ziehl-Neelsen 3 x 500mL (Newprov, Pinhais, PR, Brasil), segundo manual de instruções do fabricante.

Também foram cultivados e realizados esfregaços do controle positivo.

3.7 – Extração de DNA e Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Todas as 220 amostras de leite foram submetidas à extração de DNA e PCR.

Com a finalidade de obter-se uma amostra controle positivo de leite, foi inoculada uma alçada de MAP proveniente do meio HEYM controle positivo, em 50mL de leite em pó Molico® (Nestlé, São Paulo, SP, Brasil) reconstituído com água destilada autoclavada, conforme instruções do fabricante. Esta amostra controle positivo foi submetida ao mesmo processamento que as amostras de leite obtidas dos animais. Uma amostra controle negativa também foi obtida repetindo-se o mesmo procedimento, porém, sem a inoculação de MAP.

Para a extração de DNA de MAP foi utilizado o *kit Wizard® Genomic DNA Purification*, (Promega, Madison, WI, EUA). À primeira parte das amostras de leite reservadas para o teste de PCR foram adicionadas as soluções reagentes presentes no *kit*, conforme protocolo recomendado pelo fabricante e o DNA extraído foi armazenado a 8°C para posterior utilização. Também foi realizada a extração de DNA de MAP por fervura, incubando-se a amostra a 100°C, por 20 minutos, segundo SAMBROOK et al. (1989).

Para a realização dos testes de PCR foi utilizado o *kit Go Taq® Green Master Mix* (Promega), segundo manual de instruções do fabricante. Foram realizadas reações de PCR utilizando-se dois conjuntos de oligonucleotídeos: BN1 e BN2, com base na sequência de inserção IS900 (SIVAKUMAR et al., 2005) e F e B2, com base na sequência de inserção ISMav2 (SHIN et al., 2004) (Quadro 2). Foram utilizados 12,5µL de *Mix*; 1µL de cada oligonucleotídeo; 6,5µL de água Milli-Q e 4µL do DNA extraído na concentração de, aproximadamente, 200ng/µL, totalizando 25µL, por reação. Os programas de PCR recomendados pelos autores e os tamanhos dos fragmentos esperados são apresentados no Quadro 3.

Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, (Invitrogen, Washington, DC, EUA) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) corado com brometo de etídio (1mg/mL) (Sigma-Aldrich) utilizando-se radiação UV em transiluminador, no *Eagle Eye II* (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

Água Milli-Q foi utilizada como controle negativo e o fago ϕ X174/*HaeIII* (Promega) como marcador de peso e tamanho molecular.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Referência
IS900/BN1 *	5'-GTTATTAACGACGCCAGC-3'	(SIVAKUMAR et al., 2005)
IS900/BN2 **	5'-ACGATGCTGTGTTGGGCGTTAG-3'	
ISMav2/F *	5'-GTGAGTTGTCCGCATCAGAT-3'	(SHIN et al., 2004)
ISMav2/B2 **	5'-GCATCAAAGAGCACCTCGAC-3'	

Quadro 2. Seqüências dos dois conjuntos de oligonucleotídeos utilizados para a realização da técnica de PCR
IS – Seqüência de Inserção * Oligonucleotídeo *forward* ** Oligonucleotídeo *reverse*.

Referência	Desnaturação inicial	N.º ciclos	Ciclo			Extensão final	Fragmento (pb)
SIVAKUMAR et al., 2005	94°C/4min	30	94°C/1min	60°C/1min	72°C/1min	72°C/4min	626
SHIN et al., 2004	94°C/4min	35	94°C/30s	50°C/1min	72°C/1min	72°C/7min	494

Quadro 3. Programas de PCR utilizados e tamanhos dos fragmentos amplificados em cada um deles

3.8 – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

O ELISA do soro foi realizado no LABACVET/UFRGS, segundo protocolos do mesmo e o ELISA do leite foi realizado com o *kit Milk ELISA Paratuberculosis Antibodies Screening* (Institut POURQUIER, Montpellier, França), segundo manual de instruções do fabricante. Para eliminar reações cruzadas, as amostras avaliadas foram incubadas com *Mycobacterium phlei*, conforme instruções do fabricante.

A leitura das placas foi feita na densidade óptica de 450nm (DO₄₅₀) e os resultados foram considerados somente se a razão entre a DO₄₅₀ do controle positivo e a DO₄₅₀ do controle negativo foi maior ou igual a 3, conforme manual de instruções do fabricante. A razão S/P (amostra/controlado positivo) apresentada a seguir, constante do manual de instruções do fabricante, foi utilizada para a interpretação dos resultados.

$$S/P = \frac{100 \times (\text{valor da DO}_{450} \text{ da amostra} - \text{valor da DO}_{450} \text{ do controle negativo})}{(\text{valor da DO}_{450} \text{ do controle positivo} - \text{valor da DO}_{450} \text{ do controle negativo})}$$

Os testes foram realizados em triplicata e, para cada amostra, o valor da DO₄₅₀ utilizado foi o valor da DO₄₅₀ médio obtido das três reações. Valores S/P iguais ou menores que 30% foram considerados negativos, valores S/P entre 30 e 40% foram considerados suspeitos e valores S/P iguais ou maiores que 40% foram considerados positivos, também conforme instruções do fabricante.

3.9 – Clonagem, seqüenciamento e análise genética

Os fragmentos amplificados pelas reações de PCR e o controle positivo foram extraídos e purificados do gel de agarose 1% após eletroforese, utilizando-se o *kit Zymoclean Gel DNA Recovery* (Zymo Research, Orange, CA, EUA), segundo manual de instruções do fabricante e, em seguida, clonados em *Escherichia coli* DH5α competentes, utilizando-se o *kit pGem T-Easy Vector System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

A preparação das células competentes, a transformação e a seleção das células transformadas foram realizadas de acordo com SAMBROOK et al. (1989). As células foram plaqueadas em agar LB (Luria-Bertani) contendo 5μL/mL de ampicilina (20mg/mL), 40μL de X-gal (40μg/mL) e 10μL de IPTG (100mM), e incubadas a 37°C,

por 20h. Os clones transformados foram identificados por meio de PCR de colônia e, em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial, utilizando-se o *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System* (Promega), segundo o manual de instruções do fabricante.

O DNA plasmidial das amostras clonadas foi submetido a ensaios de restrição com a enzima *EcoRI* (Promega) para confirmação do processo de clonagem. Em cada ensaio de restrição foram adicionados 3μL do DNA plasmidial extraído, na concentração de aproximadamente 100ng/μL; 0,3μL da enzima *EcoRI*; 2μL de tampão 10x e água destilada para completar 20μL de reação. A reação foi incubada a 37°C por 2h e os fragmentos de DNA liberados foram evidenciados por eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen), em tampão TBE, corado com brometo de etídio (1mg/mL) (Sigma-Aldrich) utilizando-se radiação UV em transiluminador no *Eagle Eye II* (Stratagene). Os tamanhos dos fragmentos foram comparados utilizando-se o fago ϕ X174/*HaeIII* (Promega) como marcador de tamanho molecular.

Os plasmídeos recombinantes foram enviados ao Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foi realizado o seqüenciamento das mesmas em seqüenciador automático MegaBACE 1000 Sequencing System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), segundo o método descrito por SANGER et al. (1977), utilizando-se o *kit DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), segundo manual de instruções do fabricante. Foram utilizados os oligonucleotídeos M13 forward (5'-GGT GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') e M13 reverse (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3').

Todos os plasmídeos tiveram ambas as fitas seqüenciadas e cada um deles foi seqüenciado três vezes para maior confiabilidade dos dados. As seqüências obtidas foram editadas com o auxílio do software DNA MAN e comparadas com seqüências relacionadas no *Genbank*, utilizando-se o *software Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível no *site National Center for Biotechnology Information* - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando-se o *software ClustalW* (www.ebi.ac.uk/clustal) e a partir dos mesmos, foram realizados agrupamentos genéticos utilizando-se o *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versão 4.0 Windows

(www.megasoftware.net), pelo método UPGMA. As análises estatísticas foram realizadas por meio de 1000 repetições de *bootstrap*.

3.10 – Limite de detecção da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

O limite de detecção da técnica de PCR foi estimado por meio da extração de DNA plasmidial do clone do controle positivo com o *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System* (Promega), segundo instruções do fabricante. A concentração de microrganismos presente na solução inicial foi estimada na densidade óptica de 260nm (DO₂₆₀) e o número de microrganismos, por meio da seguinte fórmula, segundo o manual *QuantiFast™ SYBR® Green PCR Handbook* (Qiagen, Valencia, CA, EUA).

$$\text{nº. cópias do plasmídeo}/\mu\text{L} = \frac{\text{concentração da suspensão de DNA em g}/\mu\text{L}}{\text{tamanho do plasmídeo em pb} \times 660 \times 6,022 \times 10^{-23}}$$

A partir da suspensão original de DNA clonado, concentrações menores foram obtidas por meio de diluições seriadas. Alíquotas de variadas concentrações de DNA clonado foram submetidas à reação de PCR em triplicata para maior confiabilidade dos dados. Após eletroforese em gel de agarose foi possível estimar qual o número de cópias da sequência IS900 e, conseqüentemente, o número de bacilos presente na amostra detectado na reação de PCR.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos dois casos clínicos com sinais semelhantes aos da paratuberculose foram relatados primeiramente para posterior discussão com os demais resultados. Os dois animais estão sendo monitorados. Todos os resultados foram agrupados no Apêndice II para melhor visualização.

Caso Clínico I

Em fevereiro de 2007, um bovino apresentando o seguinte histórico clínico, por aproximadamente dois meses, foi atendido no HOV/DVT/UFV: fêmea, com idade aproximada de 5 anos, apresentando grande diminuição na produção leiteira, emagrecimento progressivo e manutenção do apetite. Após exame clínico inconclusivo, o animal foi submetido à laparotomia exploratória e ainda assim, permaneceu sem um diagnóstico preciso. Desse animal, aqui denominado animal 1 (Figura 3), foram coletadas amostras de leite para realização de cultivo, PCR e ELISA; amostra de fezes para realização de cultivo e amostra de sangue para realização de ELISA.

Após 18 semanas de incubação, devido à contaminação, não puderam ser isoladas colônias com características morfo-tinturiais de MAP a partir das amostras de fezes. Após o mesmo período de incubação, foram observadas algumas colônias oriundas das amostras de leite, nos tubos com Micobactina J (Figura 4A). As colônias observadas apresentaram algumas características morfológicas descritas por Collins (2003); entretanto, apesar de serem brancas, convexas e lisas, apresentaram 4-5mm de diâmetro, tamanho maior do que o descrito por Collins (2003), de 1-2mm. Corados por ZN e observados ao microscópio óptico, os

microrganismos isolados apresentaram as características morfo-tinturiais típicas de MAP: aglomerados de bacilos delgados e álcool-ácido resistentes (Figura 4B).



Figura 3. Animal 1 atendido pelo HOV/UFV, apresentando mau estado físico geral e sinais clínicos característicos de paratuberculose.

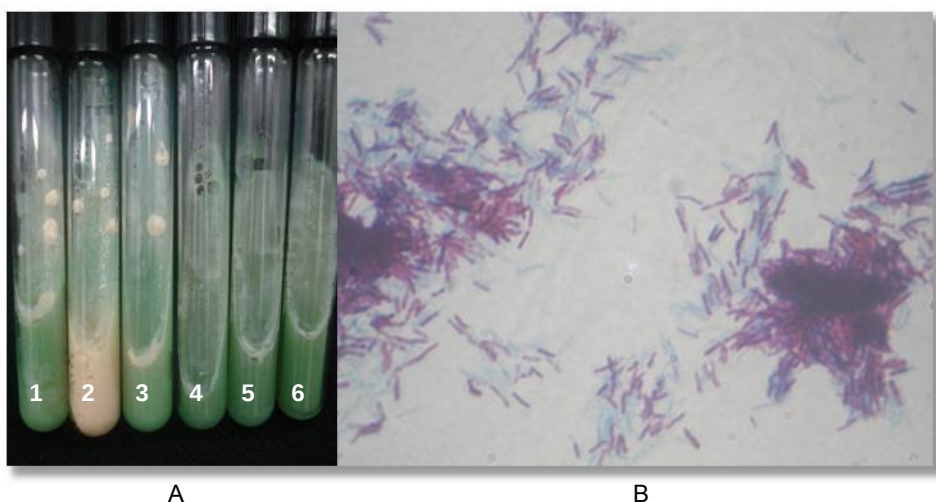


Figura 4. A1, A2, A3) Culturas de amostra de leite em tubos de meio HEYM com Micobactina J; A4, A5, A6) Culturas de amostra de leite em tubos de meio HEYM sem Micobactina J; B) Esfregaço de colônia do tubo A3 corado por Ziehl-Neelsen com aglomerados de bacilos álcool-ácido resistentes (1000x).

A amostra de leite desse animal amplificou fragmentos de tamanho semelhante ao esperado utilizando-se os pares de oligonucleotídeos baseados na sequência de inserção IS900 (Figura 6) e na sequência ISMav2. O fragmento amplificado pela reação de PCR IS900 foi clonado, seqüenciado, e as análises genéticas revelaram uma identidade de 99% com a sequência IS900 de MAP descrita por GREEN et al. (1989). A amostra de soro foi considerada suspeita e a amostra de leite foi considerada negativa quando submetidas ao teste de ELISA. Por três vezes tentou-se isolar MAP das fezes desse animal, considerando-se que esse é o método padrão-ouro de diagnóstico da doença, mas nas três vezes, a contaminação das amostras não possibilitou que se chegasse às 18 semanas de

incubação. Assim, pode ser que o microrganismo estivesse presente e viável, mas isso não pôde ser confirmado.

Analisando todos esses dados, esse animal poderia estar infectado por MAP, mas como a PCR detecta material genômico e não somente células viáveis e não se teve sucesso em cultivar o agente causador da doença, não foi possível obter um diagnóstico definitivo de paratuberculose.

Caso Clínico II

Durante a coleta de amostras em uma das propriedades incluídas no estudo, o proprietário relatou o caso de um animal de, aproximadamente, seis anos de idade, com diarreia, emagrecimento, redução da produção leiteira e manutenção do apetite havia aproximadamente um mês, sem causas aparentes, e que também não respondia a tratamento. Desse animal, denominado animal 2 (Figura 5), foram coletadas amostras de leite, fezes e sangue para serem submetidas aos mesmos testes que as amostras coletadas do animal 1.

Após 18 semanas de incubação, não foram observadas colônias com características morfo-tinturiais de MAP a partir das amostras de fezes ou de leite.



Figura 5. Animal 2, em uma das propriedades incluídas no estudo, apresentado mau estado físico geral e sinais clínicos característicos de paratuberculose.

Nas reações de PCR utilizando-se o par de oligonucleotídeos BN1/BN2 com base na seqüência de inserção IS900, a amostra de leite do animal 2 amplificou fragmento de tamanho semelhante ao esperado (Figura 6). Nos testes de ELISA do leite e do soro, o animal 2 foi considerado negativo.

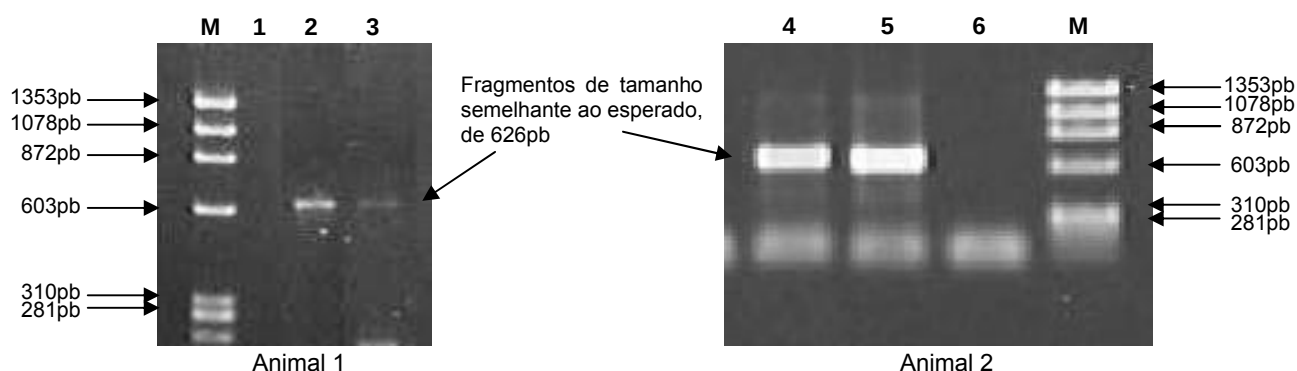


Figura 6. Produtos de PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos BN1/BN2, evidenciados por eletroforese em gel de agarose 1%. M) Marcador de tamanho molecular: fago ϕ X174/HaeIII; 1 e 6) Controle negativo: Água Milli-Q; 2 e 4) Controle positivo; 3) Animal 1; 5) Animal 2.

4.1 – Cultivo de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP)

As 204 amostras de fezes coletadas foram inoculadas em 816 tubos. Desses, 334 (41%) não foram descontaminados adequadamente. Da mesma maneira, as 220 amostras de leite (204 amostras de leite individual e 16 amostras de leite de tanque) coletadas foram inoculadas em 880 tubos, dos quais 132 (15%) não foram descontaminados adequadamente. O fato da contaminação nos tubos com amostras de fezes ter apresentado maior contaminação, comparados aos tubos com amostras de leite pode ser explicado pelo fato de que fezes são naturalmente contaminadas, contendo muitas outras espécies de bactérias e esporos de fungos, os quais seriam responsáveis pela maior contaminação observada. Ainda assim, a contaminação observada nas amostras de leite foi bastante alta, o que pode ser um forte indicativo da qualidade do leite avaliado no presente estudo.

Após 18 semanas de incubação, foram observadas várias colônias provenientes das amostras de leite e de fezes, em tubos com e sem Micobactina J. Os critérios para identificação de colônias de MAP geralmente são as características morfo-tinturiais, o tempo de crescimento das mesmas e a dependência à Micobactina (COLLINS, 2003). Considerando todos esses critérios, nenhuma das colônias observadas apresentou características típicas de MAP. Sob a coloração de ZN, foram observados BAAR em 174 (85%) dos esfregaços preparados a partir das amostras de fezes descontaminadas, entretanto, a técnica de ZN não é específica para MAP (SAKULA, 1982). Dessa forma, a presença desses bacilos não comprova a existência de MAP nas amostras analisadas, mas indica a presença de BAAR nas mesmas.

A contaminação de tubos, principalmente tratando-se das amostras de fezes (41%), e conseqüente perda de dados foi um importante problema detectado ao longo do presente estudo, visto que a cultura fecal é o método padrão-ouro para diagnóstico da paratuberculose. O isolamento de MAP é difícil, principalmente tratando-se de amostras de fezes (COCITO et al., 1994). São necessárias etapas de descontaminação das amostras antes do cultivo, em função da presença de outros microrganismos, os quais podem interferir no isolamento de MAP, uma vez que esse microrganismo tem crescimento bastante lento. Vários pesquisadores avaliaram diferentes metodologias para diminuir a contaminação das amostras durante o período de incubação e ainda não existe um padrão ideal para descontaminação das amostras (WHIPPLE et al., 1991; DUNDEE et al., 2001; RISTOW et al., 2006). A maior dificuldade é encontrar um método que aumente a descontaminação sem comprometer o crescimento de MAP (STABEL, 1997). Foram avaliados alguns protocolos utilizados na descontaminação de amostras (dados não mostrados) e um método ainda está sendo otimizado pelo laboratório para ser utilizado em novos estudos.

Assim, o insucesso no isolamento de MAP a partir de amostras de fezes pode estar associado ao problema de contaminação ou à ausência de MAP e conseqüentemente da doença nos rebanhos testados. Isso, entretanto, está em desacordo com os estudos de prevalência da doença no Brasil. Estudos recentes em vários estados brasileiros estimaram dados de prevalência variando de 30 a 60,24% (RIVERA, 1996; LARANJA-DA-FONSECA et al., 1999; ACYPRESTE et al., 2005; GOMES et al., 2005; RISTOW et al., 2007).

No estado de Minas Gerais, não existem estudos sobre a prevalência da doença, mas foi relatado em 1991, em Juiz de Fora, o caso de uma vaca holandesa, importada, de cinco anos de idade, adquirida no Paraná, que apresentou diarreia persistente e não respondia a tratamento. Durante a necropsia, foram encontradas lesões intestinais típicas da paratuberculose, foram observados BAAR corados por ZN em exame histopatológico e foi cultivado BAAR em meio com micobactina, confirmando a etiologia da doença (NAKAJIMA et al., 1991).

Apesar de ser considerado padrão-ouro para o diagnóstico da paratuberculose, o cultivo fecal apresenta baixa sensibilidade na detecção do agente (SANFTLEBEN, 1990). Considerando a eliminação intermitente do bacilo como

característica da enfermidade (COCITO et al., 1994), o número de bactérias eliminadas no leite ou nas fezes poderia ser pequeno quando as amostras foram coletadas, o que também poderia explicar os resultados do presente estudo. Considerando as amostras de leite coletadas dos tanques das propriedades estudadas, o isolamento pode não ter acontecido em função da diluição que ocorre nesse tipo de amostra, uma vez que o leite dos animais possivelmente infectados é misturado ao leite de todo o rebanho.

Essas possibilidades devem ser consideradas, uma vez que o controle positivo foi subcultivado no meio HEYM produzido pelo LDBAC e seu crescimento foi observado somente nos tubos com Micobactina J. Assim, possivelmente o problema da contaminação observado está no procedimento de descontaminação das amostras, visto que como houve adequado crescimento do controle positivo, após 18 semanas de incubação, provavelmente o meio produzido está funcionando bem para o isolamento de MAP. Uma padronização dos métodos utilizados para descontaminação das amostras está sendo realizada pelo LDBAC.

4.2 – Extração de DNA e Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Todas as amostras de leite foram submetidas à extração de DNA para posterior realização da PCR. Foram realizadas extrações de DNA comparando-se os protocolos por *kit*, por fervura (SAMBROOK et al., 1989) e utilizando-se uma amostra unindo sedimento e gordura (SINGH e VIHAN, 2004). Maiores concentrações de DNA foram obtidas utilizando-se a extração por *kit* e não se obteve sucesso no processo de extração a partir das amostras unindo o sedimento e a camada de gordura. Não foi possível purificar, por meio de fervura ou do *kit*, o DNA extraído a partir dessas amostras. Ao ser evidenciado por meio de eletroforese em gel de agarose, as moléculas de DNA não puderam ser observadas, provavelmente em função da grande quantidade de gordura presente nessas amostras. Foram realizadas também extrações de DNA das colônias de MAP da amostra controle. Nessas amostras, com a extração por fervura, foram obtidas, aproximadamente, as mesmas quantidades de DNA obtidas com a extração por *kit*.

Excluindo-se os animais com sinais clínicos, foram testadas 202 amostras de leite de vacas aparentemente sadias e 16 amostras de leite de tanque de propriedades sem relato de paratuberculose. Dentre as 218 amostras, 6 (2,7%)

foram positivas utilizando-se os oligonucleotídeos IS900/BN1 e IS900/BN2 e 3 (1,4%) foram positivas utilizando-se os oligonucleotídeos ISMav2/F e ISMav2/B2. Os dois pares de oligonucleotídeos foram utilizados seguindo-se os protocolos descritos quando os mesmos foram desenhados (SHIN et al., 2004; SIVAKUMAR et al., 2005) e apresentaram resultados ideais também para as condições avaliadas.

Existem poucos estudos publicados que utilizam a técnica de PCR para detecção de MAP em amostras de leite individual *in natura*. Na maioria dos estudos, a técnica é usada em amostras de leite de tanque ou em amostras de leite pasteurizado (MILLAR et al., 1996; CORTI e STEPHAN, 2002; STABEL et al., 2002; AYELE et al., 2005). No Brasil, este é o primeiro estudo onde foi detectada a presença de MAP em amostras de leite.

GIESE e AHRENS, (2000) utilizaram amostras de leite individual para detectar MAP em animais com sinais clínicos da doença e foram amplificados fragmentos de tamanho esperado em 5 (45%) dos 11 animais testados. Na Argentina, PAOLICCHI et al., (2003) utilizaram amostras de leite individual para pesquisar MAP em animais sem sinais clínicos da doença e não foram amplificados fragmentos de tamanho esperado em nenhuma das 24 amostras testadas. JAYARAO et al. (2004) encontraram fragmentos de tamanho esperado em 201 (13%) de 1493 amostras de leite individual de 29 propriedades, em 16 das quais não havia sido relatada a doença. Os resultados constatados no presente estudo, portanto, estão de acordo com os resultados observados em estudos publicados quando foram analisadas amostras de leite individual de animais de propriedades sem relato de paratuberculose. Isso sugere que o teste de PCR com base na sequência IS900 pode ser uma ferramenta valiosa no auxílio do diagnóstico da paratuberculose.

As amplificações das amostras avaliadas, com ambos os pares de oligonucleotídeos, podem ser observadas na Figura 7. Do total de amostras, 8 (3,6%) amplificaram fragmentos com o uso dos oligonucleotídeos IS900/BN1 e IS900/BN2 e dessas, 5 (62,5%) amplificaram fragmentos com o uso dos oligonucleotídeos ISMav2/F e ISMav2/B2.

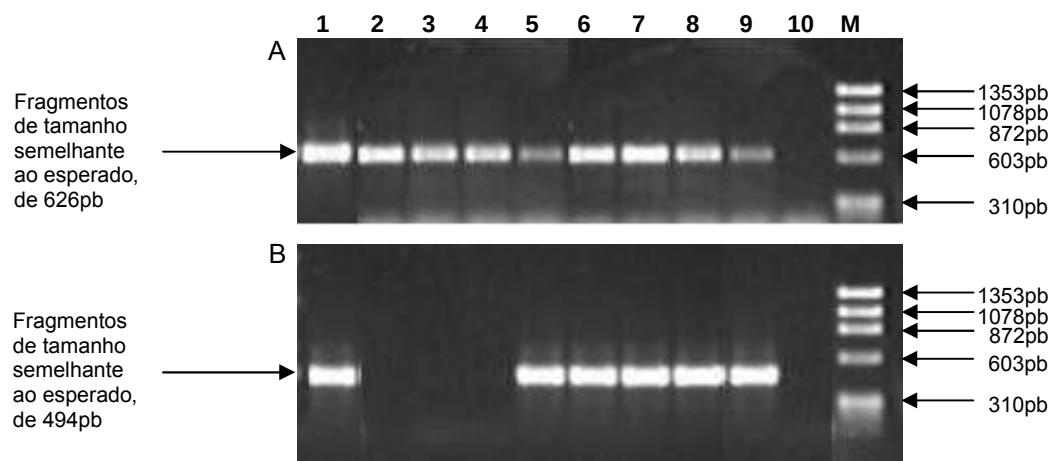


Figura 7. Produtos de PCR evidenciados por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando os pares de oligonucleotídeos BN1/BN2 (A) e F/B2 (B). 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) Amostras amplificadas; 9) Controle positivo; 10) Controle negativo: água Milli-Q; M) Marcador de tamanho molecular: fago ϕ X174/*Hae*III.

Como foram amplificadas amostras de animais que apresentavam sinais clínicos semelhantes aos da doença e de animais clinicamente sadios, pode-se inferir que o teste de PCR é um importante método de auxílio no diagnóstico de paratuberculose, já que possibilita a detecção de animais com e sem manifestações clínicas da doença. Os animais que amplificaram fragmentos de tamanho esperado, mas não apresentaram sinais clínicos semelhantes aos da doença, poderiam estar infectados nos estádios iniciais da enfermidade, quando já eliminam o microrganismo para o ambiente, mas ainda não apresentam sinais clínicos.

Dentre as 8 amostras amplificadas nos testes de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos IS900/BN1 e IS900/BN2, 7 (87,5%) eram de animais de duas ou mais crias, portanto, animais adultos, com, aproximadamente, 3 a 5 anos de idade, enquadrando-se na faixa etária na qual a paratuberculose manifesta-se com mais frequência.

Estudos têm mostrado que a sequência de inserção IS900 não é completamente específica de MAP, pois oligonucleotídeos que se baseiam nessa sequência amplificaram fragmentos de tamanho semelhante ao esperado em outras micobactérias que não MAP (COUSINS et al., 1999; ENGLUND et al., 2002). Assim, novas sequências de inserção vêm sendo pesquisadas para serem utilizadas como ferramentas moleculares para a detecção de MAP (STROMMINGER et al., 2001; PAUSTIAN et al., 2004). Em função dessa especificidade incompleta da sequência IS900, foram realizados nesse estudo dois testes de PCR, com oligonucleotídeos

com base na seqüência IS900 e na seqüência ISMav2, com o objetivo de confirmar as reações positivas obtidas no primeiro teste.

As duas amostras de leite de animais com sinais clínicos testadas por PCR amplificaram fragmentos de tamanho semelhante ao esperado, de 626pb, com o uso dos oligonucleotídeos IS900/BN1 e IS900/BN2 e de 494pb, com o uso dos oligonucleotídeos ISMav2/F e ISMav2/B2, confirmando a presença de DNA de MAP nessas amostras.

Em três (37,5%) das oito amostras, os resultados obtidos comparando-se os dois pares de oligonucleotídeos foram diferentes. Isso pode ser explicado pela diferença de sensibilidade entre as seqüências de inserção, pois a seqüência IS900 está presente em aproximadamente 14 a 18 cópias (GREEN et al., 1989), enquanto a seqüência ISMav2 está presente em aproximadamente apenas três cópias no genoma de MAP (STROMMINGER et al., 2001), sendo a primeira, portanto, mais sensível e a segunda mais específica para a detecção do microrganismo.

Como a concentração inicial de microrganismos presentes nas amostras era desconhecida, pode ser que naquelas onde não foram amplificados fragmentos de tamanho esperado utilizando-se o segundo par de oligonucleotídeos, o microrganismo estivesse presente em concentração menor, não sendo assim, detectado. Portanto, embora novas seqüências de inserção venham sendo descritas como ferramentas alternativas para o diagnóstico da paratuberculose, a seqüência IS900 ainda é a mais utilizada sendo as outras utilizadas para confirmação de resultados positivos obtidos com a primeira (STROMMINGER et al., 2001; PAUSTIAN et al., 2004). A amplificação de fragmentos de tamanho semelhante ao esperado utilizando-se ambos os pares de oligonucleotídeos confirmou a presença de DNA de MAP em cinco (62,5%) das oito amostras.

Duas (25%) das oito amostras de DNA amplificadas foram degradadas não podendo ser utilizadas em experimentos posteriores. As outras seis amostras foram clonadas para posterior análise genética.

Sobre as três amostras não confirmadas como MAP com a utilização dos dois pares de oligonucleotídeos, não se pode afirmar que não contenham MAP, pois duas delas foram degradadas, e a outra foi clonada, mas houve problemas no seu seqüenciamento. Assim, não pode ser descartada a hipótese de que essas amostras poderiam conter DNA de MAP, embora não tenham amplificado fragmentos

utilizando-se o segundo par de oligonucleotídeos. Como descrito anteriormente, reações de PCR com base na sequência ISMav2 são menos sensíveis que reações com base na sequência IS900, dado o número de cópias de cada uma delas presente no genoma de MAP. A concentração inicial de microrganismos nas amostras era desconhecida, possibilitando o microrganismo não ser detectado pelo segundo par de oligonucleotídeos caso estivesse presente em concentração menor.

A detecção de DNA de MAP por PCR e a ausência de colônias obtidas a partir de amostras de fezes pode ser associada ao fato de MAP não estar presente em sua forma viável, mas também pode ser explicada pelo problema de contaminação verificado.

4.3 – *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)*

Das 8 amostras testadas pelo teste de ELISA, somente duas eram de animais com sinais clínicos semelhantes aos da doença. Das amostras de soro testadas, duas (25%) foram consideradas positivas, enquanto que das amostras de leite submetidas ao teste de ELISA, todas foram consideradas negativas.

A paratuberculose é uma infecção crônica com uma resposta imune prolongada. A resposta imune primária é mediada por células, onde a produção de anticorpos pode acontecer, mas não é comum. Como a resposta de anticorpos depende diretamente do progresso da doença, a sensibilidade do ELISA é alta em animais que apresentam a forma clínica da doença (COLLINS et al., 1993; STABEL, 2000; WHITLOCK et al., 2000), enquanto 63 a 91% dos animais sem sinais clínicos não são detectados por testes sorológicos (EAMENS et al., 2000; MUSKENS et al., 2003).

Em um teste sorológico repetido por um período de nove meses em animais sem sinais clínicos de paratuberculose, foi observada a soroconversão em, aproximadamente, 64% dos animais negativos no primeiro teste (EAMENS et al., 2000). Assim, a falta de reação não significa que os animais não estejam infectados; eles podem estar infectados, mas ainda não desenvolveram uma resposta imune humoral significativa contra o agente. Os resultados encontrados, portanto, estão de acordo com a baixa sensibilidade do ELISA em animais sem sinais clínicos da doença.

Embora uma porção significativa das moléculas de IgG presentes no leite seja derivado do transporte de IgG do soro, a maior parte delas é produzidas por células da glândula mamária. Como a infecção por MAP inicialmente é localizada no intestino, a presença de grandes quantidades de IgG no leite não é esperada nos estádios iniciais da doença, sem sinais clínicos (LOMBARD et al., 2006). Em função disso, comparando-se os resultados dos testes de ELISA utilizando amostras de soro e de leite, era esperado que os testes de ELISA do leite apresentassem resultados diferentes dos testes de ELISA do soro.

4.4 – Clonagem, seqüenciamento e análise genética

O DNA plasmidial de todos os oito clones foi submetido a ensaio de restrição com a enzima *EcoRI* (Promega) para confirmação do processo de clonagem (Figura 8). Todas as amostras testadas liberaram os fragmentos do tamanho esperado, de 626pb, o que confirma o sucesso do processo de clonagem.

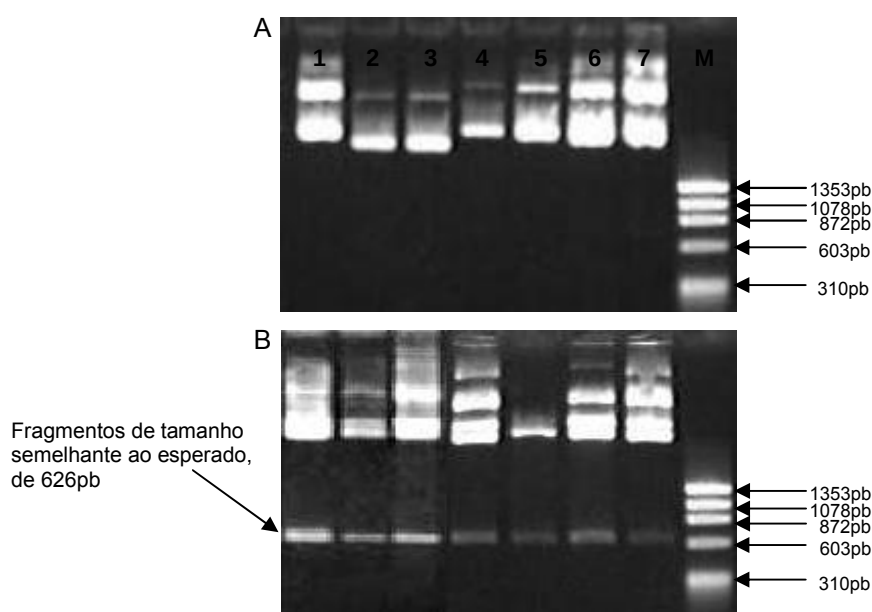


Figura 8. DNA plasmidial antes (A) e após (B) o ensaio de restrição com a enzima *EcoRI*. 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) Amostras avaliadas; M) Marcador de tamanho molecular: fago ϕ X174/*HaeIII*.

Das 7 amostras enviadas ao NAGE/UFMG (6 amostras de animais desse estudo, dentre as quais os dois casos que apresentavam sinais clínicos e o controle positivo), somente 4 (57%) foram seqüenciadas com sucesso. Todas as amostras foram enviadas em triplicata para que não ocorressem problemas e, conseqüentemente, houvesse maior confiabilidade dos dados obtidos. Ainda assim,

houve problemas e três amostras não puderam ser seqüenciadas. Elas foram novamente enviadas para o NAGE/UFMG e serão posteriormente analisadas. O controle foi denominado MAP-UFGRS e as 3 amostras oriundas do presente estudo foram denominadas MAP-UFV/07, MAP-UFV/09 e MAP-UFV/J.

Para determinar se o fragmento de 626pb, amplificado no teste de PCR com oligonucleotídeos com base na seqüência IS900, era específico de MAP, as seqüências clonadas e seqüenciadas foram comparadas com a descrição da seqüência de inserção IS900 (GREEN et al., 1989) depositada no *Genbank* sob o número de acesso X16293.1 (seta preta). A análise revelou 99% de identidade entre as seqüências obtidas nesse estudo e a seqüência X16293.1, o que permite inferir que são realmente amostras de MAP (Tabela 1), embora nenhum animal desse estudo tenha apresentado um diagnóstico definitivo por meio do isolamento e identificação do agente.

Na análise entre as seqüências desse estudo e seqüências relacionadas depositadas no *Genbank*, verificou-se que a porcentagem de identidade entre as quatro seqüências e as seqüências de MAP já depositadas no banco variou de 90 a 100% e entre as quatro seqüências e as seqüências de *M. avium*, foi de 90% (Tabelas 1 e 2). Entre as quatro seqüências e uma seqüência de *Mycobacterium* sp. ainda não identificada, as identidades variaram de 91 a 92% e entre as 4 seqüências e uma seqüência de *Streptomyces turgidiscabies* a identidade foi de 74% (Tabela 3).

Dentre todas as seqüências das Tabelas 1, 2 e 3, obtidas por similaridade com as seqüências obtidas nesse estudo, 11 foram selecionadas aleatoriamente para que fosse realizado um alinhamento e posterior agrupamento genético. Parte do alinhamento genético entre as seqüências obtidas nesse estudo e as seqüências selecionadas pode ser visto na Figura 9.

A partir do alinhamento entre os 626 nucleotídeos, foi construído um agrupamento genético entre as 15 seqüências alinhadas (Figura 10). Foi encontrado alto grau de similaridade entre as seqüências alinhadas. Somente a seqüência AF455252.1, depositada no *Genbank*, apresentou similaridade menor. Como as seqüências alinhadas foram seqüências de MAP, isso já era esperado, uma vez que se desejava, com o seqüenciamento, provar que os fragmentos obtidos nas reações de PCR realmente eram fragmentos de MAP. A seqüência AF455252.1 apresentou

menor grau de similaridade provavelmente por se tratar de uma espécie de *Mycobacterium* sp. ainda não identificada (ENGLUND et al., 2002).

Tabela 1: Comparações entre as seqüências de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) obtidas no presente estudo e seqüências de MAP depositadas no Genbank

Nº. de acesso	MAP-UFRGS	MAP-UFV/07	MAP-UFV/09	MAP-UFV/J ¹
X69575.1	100%	100%	100%	100%
EU232748.1	100%	100%	100%	-
EU130943.1	100%	100%	100%	-
EU057175.1	100%	100%	100%	-
EU057174.1	100%	100%	100%	-
EU057173.1	100%	100%	100%	-
EU057172.1	100%	100%	100%	-
EU057168.1	100%	100%	100%	-
EU057167.1	100%	100%	100%	-
EU057165.1	100%	100%	100%	-
EU057164.1	100%	100%	100%	-
EU057156.1	100%	100%	100%	-
EU057155.1	100%	100%	100%	-
EU057153.1	100%	100%	100%	-
EF536056.1	100%	100%	100%	-
EF536055.1	100%	100%	100%	-
EF536048.1	100%	100%	100%	-
EF536046.1	100%	100%	100%	-
EF536043.1	100%	100%	100%	-
EF536042.1	100%	100%	100%	-
EF536041.1	100%	100%	100%	-
EF536040.1	100%	100%	100%	-
EF536039.1	100%	100%	100%	-
EF536038.1	100%	100%	100%	-
EF514833.1	100%	100%	100%	-
EF514831.1	100%	100%	100%	-
EF514829.1	100%	100%	100%	-
EF514828.1	100%	100%	100%	-
EF514825.1	100%	100%	100%	-
EF514824.1	100%	100%	100%	-
EF015397.1	100%	100%	100%	99%
AY974347.1	100%	100%	100%	-
AY974345.1	100%	100%	100%	-
AB052552.1	100%	100%	100%	-
X16293.1²	99%	99%	99%	99%
S74401.1	99%	99%	99%	99%
EU092639.1	99%	100%	99%	99%
EF059898.1	99%	100%	99%	99%
AY660658.1	99%	99%	99%	99%

¹ A seqüência MAP-UFV/J obtida no estudo foi de 383pb e, provavelmente, por isso, não foi possível observar identidades entre ela e as seqüências marcadas com (-).

² Acesso X16293.1 = Seqüência IS900 (GREEN et al., 1989).

CONTINUA

Nº. de acesso	MAP-UFRGS	MAP-UFV/07	MAP-UFV/09	MAP-UFV/J
AY660657.1	99%	99%	99%	99%
AJ251437.1	99%	99%	99%	99%
AJ251436.1	99%	99%	99%	99%
AJ251435.1	99%	99%	99%	99%
AJ251434.1	99%	99%	99%	99%
AJ250023.1	99%	99%	99%	99%
AJ250022.1	99%	99%	99%	99%
AJ250021.1	99%	99%	99%	99%
AJ250020.1	99%	99%	99%	99%
AJ250019.1	99%	99%	99%	99%
AJ250018.1	99%	99%	99%	99%
AJ250017.1	99%	99%	99%	99%
AJ250016.1	99%	99%	99%	99%
AJ250015.1	99%	99%	99%	99%
AJ011838.1	99%	99%	99%	99%
AF416985.1	99%	99%	99%	99%
AF305073.1	99%	100%	99%	99%
AE016958.1	99%	100%	99%	99%
EU057171.1	98%	98%	98%	-
EU057170.1	98%	98%	98%	-
EF536058.1	98%	98%	98%	-
EF536047.1	98%	98%	98%	-
EU232747.1	97%	97%	97%	-
EF514818.1	97%	97%	97%	-
AY974348.1	97%	97%	97%	-
AY974346.1	97%	97%	97%	-
EU714039.1	96%	96%	96%	-
EU714035.1	96%	96%	96%	-
EU232756.1	96%	96%	96%	-
EU232755.1	96%	96%	96%	-
EU057169.1	96%	97%	97%	-
EU057166.1	96%	97%	97%	-
EU057158.1	96%	97%	97%	-
EU057157.1	96%	97%	97%	-
EF536044.1	96%	96%	96%	-
EU057154.1	95%	95%	95%	-
EU714041.1	93%	93%	93%	-
EU232753.1	93%	94%	94%	-
EU232752.1	93%	94%	94%	-
S74415.1	90%	90%	90%	-

¹ A sequência MAP-UFV/J obtida no estudo foi de 383pb e, provavelmente, por isso, não foi possível observar identidades entre ela e as seqüências marcadas com (-).

Tabela 2: Comparações entre as seqüências de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) obtidas no presente estudo e seqüências de *Mycobacterium avium* depositadas no Genbank

Nº. de acesso	MAP-UFRGS	MAP-UFV/07	MAP-UFV/09 ¹
X59272.1	90%	90%	90%
X58030.1	90%	90%	90%
AF527973.1	90%	90%	90%
AF527972.1	90%	90%	90%
AF527971.1	90%	90%	90%
AF527970.1	90%	90%	90%
AF527969.1	90%	90%	90%
AF527968.1	90%	90%	90%
AF527967.1	90%	90%	90%
AF527966.1	90%	90%	90%
AF527965.1	90%	90%	90%
AF527964.1	90%	90%	90%
AF527963.1	90%	90%	90%
AF527962.1	90%	90%	90%
AF527961.1	90%	90%	90%
AF527960.1	90%	90%	90%
AF527959.1	90%	90%	90%
AF527958.1	90%	90%	90%
AF527957.1	90%	90%	90%

¹ A seqüência MAP-UFV/J obtida no estudo foi de 383pb e, provavelmente, por isso, não foi possível observar identidades entre ela e as seqüências de *Mycobacterium avium*.

Tabela 3: Comparações entre as seqüências de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) obtidas no presente estudo e as seqüências AF455252.1 (*Mycobacterium* sp.) e AY707080.1 (*Streptomyces turgidiscabies*) depositadas no Genbank

Nº. de acesso	MAP-UFRGS	MAP-UFV/07	MAP-UFV/09	MAP-UFV/J ¹
AF455252.1	92%	92%	92%	91%
AY707080.1	74%	74%	74%	-

¹ A seqüência MAP-UFV/J obtida no estudo foi de 383pb e, provavelmente, por isso, não foi possível observar identidade entre ela e a seqüência de *Streptomyces turgidiscabies*.

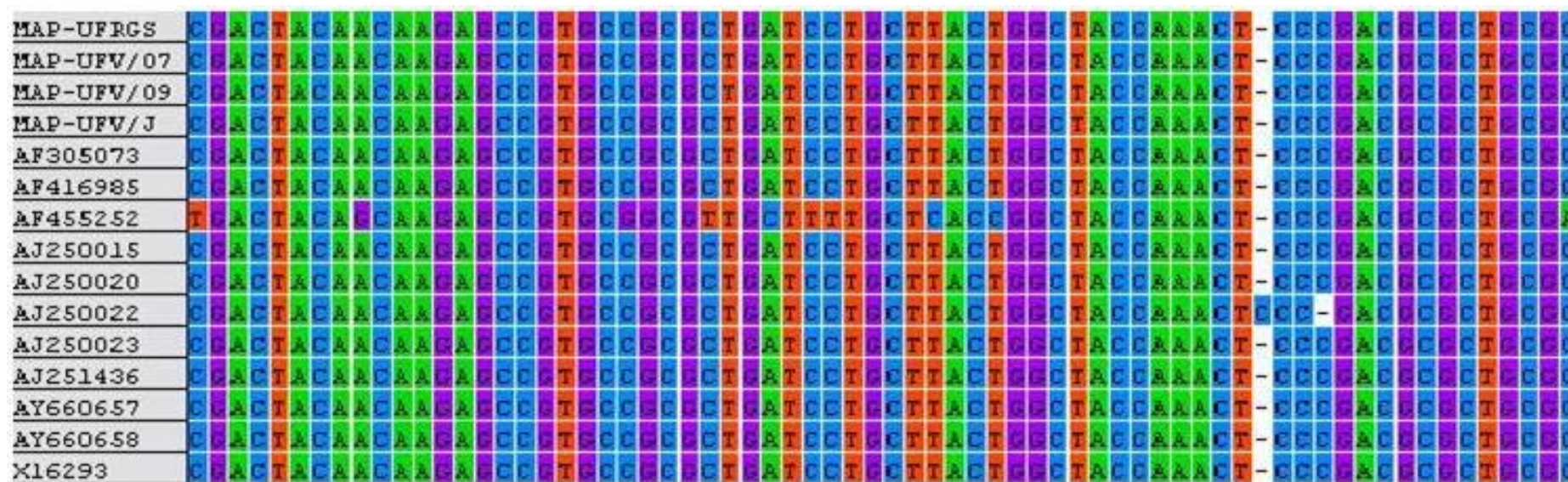


Figura 9. Parte do alinhamento genético entre os 626 nucleotídeos dos fragmentos de DNA seqüenciados e seqüências já existentes no *Genbank*.

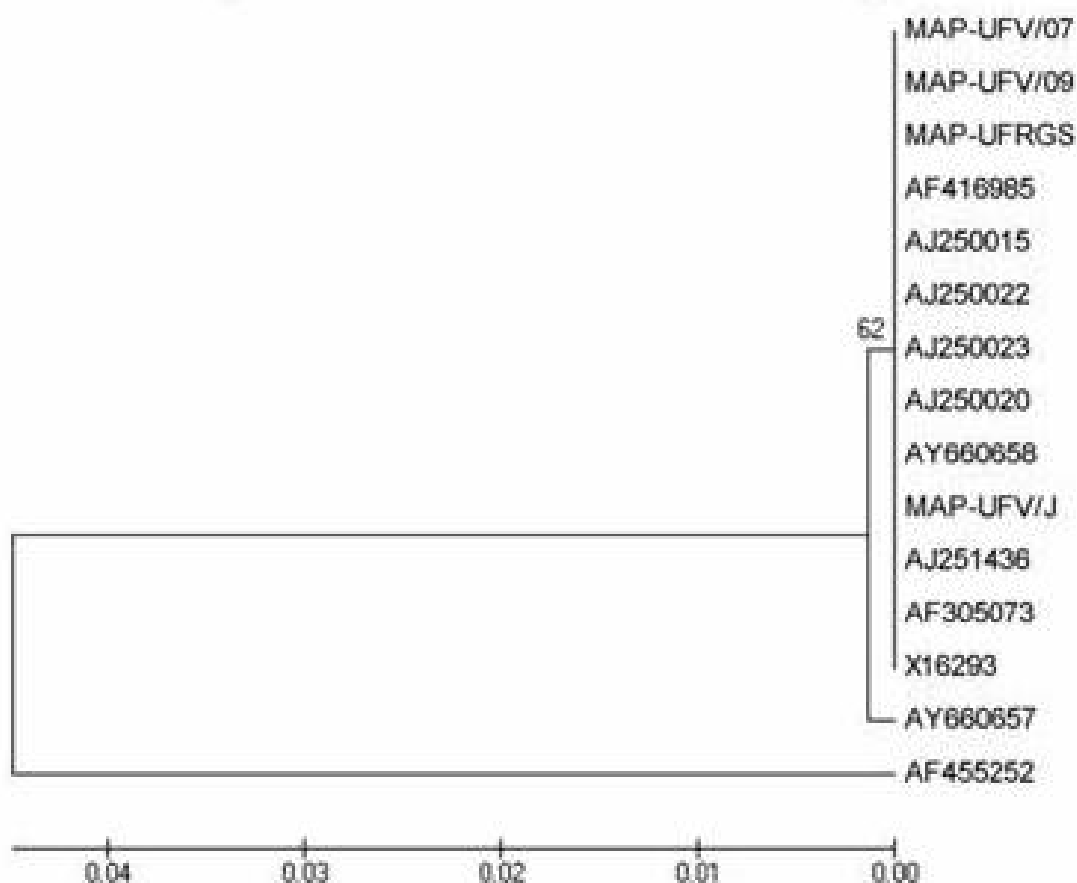


Figura 10. Agrupamento genético entre as seqüências de MAP descritas no presente estudo (MAP-UFRGS; MAP-UFV/07; MAP-UFV/09 e MAP-UFV/J) e seqüências disponíveis no *Genbank* (AF305073; AF416985; AF455252; AJ250015; AJ250020; AJ250022; AJ250053; AJ251436; AY660657; AY660658 e X16293). Método: UPGMA; Suporte estatístico: 1000 repetições de *bootstrap*.

4.5 – Limite de detecção da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

O limite de detecção da técnica de PCR foi estimado por meio de reações utilizando-se diluições seriadas de DNA plasmidial e os oligonucleotídeos BN1 e BN2, com base na seqüência de inserção IS900, segundo os protocolos descritos por SIVAKUMAR et al. (2005). Foi constatado que a técnica foi capaz de detectar até o limite de 2×10^3 cópias de plasmídeos em cada reação de PCR (Figura 11). Considerando que cada célula de MAP possui entre 14 a 18 cópias da seqüência IS900, (GREEN et al., 1989) e que em cada reação foram utilizados 4 μ L de DNA extraído de 20mL de leite, ressuspendido em 100 μ L; o limite mínimo de detecção da técnica validada pelo LDBAC foi de, aproximadamente, 140 a 180UFC/mL de leite. O limite encontrado foi semelhante aos descritos por PILLAI e JAYARAO (2002) de 10 a 100UFC/mL e por MILLAR et al. (1996), de 200 a 300UFC/mL de leite. Em

contraste com esses estudos, GIESE e AHRENS (2000) relataram um limite de detecção de 1000UFC/mL de leite. Nesse último estudo, os próprios pesquisadores consideraram o limite alto e propuseram que a baixa sensibilidade encontrada poderia ter sido causada por uma extração de DNA deficiente ou ao pequeno volume de leite (200µL) usado no procedimento.

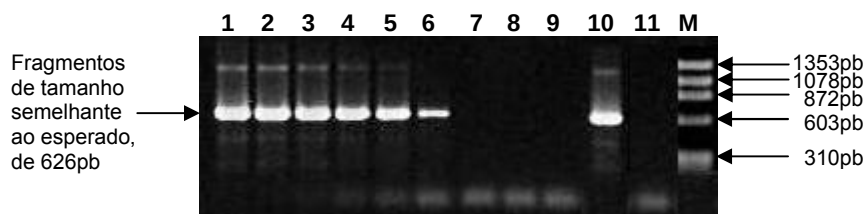


Figura 11. Diluições de DNA plasmidial nas seguintes concentrações: 1) 2×10^8 cópias; 2) 2×10^7 cópias; 3) 2×10^6 cópias; 4) 2×10^5 cópias; 5) 2×10^4 cópias; 6) 2×10^3 cópias; 7) 2×10^2 cópias; 8) 20 cópias; 9) 2 cópias; 10) Controle positivo; 11) Controle negativo: água Milli-Q; M) Marcador de tamanho molecular: fago ϕ X174/HaeIII

Nenhum dos estudos citados utilizou os mesmos conjuntos de oligonucleotídeos desse estudo. Resultados divergentes também podem ser explicados pelas diferenças nas condições utilizadas para a realização da técnica de PCR.

As amostras de leite de tanque analisadas foram negativas para todos os testes aos quais foram submetidas. Esse resultado provavelmente deve-se à diluição que ocorre nos tanques das propriedades, quando o leite dos animais possivelmente infectados é misturado ao leite de todos os animais do rebanho. Isso reduz a concentração do agente causador nesse tipo de amostra, sendo bastante difícil detectar MAP por esse método, em rebanhos sem histórico clínico da doença (STABEL et al., 2002). O limite de detecção estimado pelo presente estudo foi de 140 a 180UFC/mL de leite e MAP provavelmente estaria presente em amostras de leite de tanque em números bem menores.

Assim, constatou-se que o limite de detecção da técnica para as condições avaliadas, apresentou resultados semelhantes aos encontrados por grupos de pesquisa já consolidados, o que permite inferir que a PCR é uma valiosa ferramenta no diagnóstico da paratuberculose bovina, aliada à cultura fecal, método padrão-ouro de diagnóstico.

4.6 – Levantamento sobre a paratuberculose na região de Viçosa - MG

Embora a paratuberculose exista no Brasil, a prevalência de MAP nos rebanhos bovinos leiteiros brasileiros como um todo ainda é desconhecida. No Mato Grosso do Sul, RIVERA (1996) estimou uma prevalência de 45,51% dentre 639 amostras testadas; em São Paulo, LARANJA-DA-FONSECA et al. (1999) estimaram uma prevalência de 37,9% dentre 40 animais testados; ACYPRESTE et al. (2005) estimaram uma prevalência de 60,24% dentre os 166 animais testados em Goiânia; no Rio Grande do Sul, GOMES et al. (2005) estimaram uma prevalência de 44,6% dentre 1316 amostras; e no estado do Rio de Janeiro, RISTOW et al. (2007) estimaram uma prevalência de 30% em 140 animais testados. Em Minas Gerais não existem estudos de prevalência sobre a paratuberculose, embora a doença já tenha sido relatada (NAKAJIMA et al., 1991).

Utilizando-se PCR IS900 em amostras de leite individual *in natura* com uma amostragem de 204 animais e com o limite de detecção de 140 a 180UFC/mL de leite, encontrado no presente estudo, estimou-se que a ocorrência da doença nos rebanhos testados seja de 3,6%. Este é o primeiro estudo, no Brasil, onde foi detectada a presença de MAP em amostras de leite.

Os resultados constatados no presente estudo encontram-se abaixo da prevalência estimada em outros estados do país. Todos os estudos citados acima utilizaram a técnica de ELISA para estimativa da ocorrência da enfermidade; e como foram usadas metodologias diferentes, os resultados devem ser interpretados com cautela. É razoável considerar os resultados de prevalência obtidos nesse estudo como um primeiro levantamento sobre a doença no estado de Minas Gerais.

Em função da importância sócio-econômica e em Saúde Pública da paratuberculose, espera-se que os resultados obtidos nesse estudo contribuam para que a técnica de PCR possa ser utilizada no diagnóstico rápido e eficiente de MAP em amostras de leite bovino *in natura*; considerando que a detecção precoce de MAP é importante para a implementação de um programa de controle da doença no país.

5. CONCLUSÕES

✓ MAP não foi isolado a partir das amostras de fezes testadas e foi isolado a partir de uma amostra de leite de um animal com sinais clínicos semelhantes aos da paratuberculose, permitindo inferir que não havia MAP nas amostras testadas ou o problema de contaminação observado interferiu nos resultados do presente estudo.

✓ Anticorpos contra MAP foram detectados em duas amostras de soro e não foram detectados em nenhuma nas amostras de leite testadas, a partir do que se conclui que MAP poderia estar presente nas amostras positivas.

✓ Em cinco amostras de leite, os fragmentos amplificados pela PCR ISMav2 confirmaram os resultados obtidos pela PCR IS900, podendo-se inferir que DNA de MAP estava realmente presente nessas amostras, produzindo a primeira detecção de MAP em amostras de leite no Brasil.

✓ Tendo sido encontradas identidades de 99% entre as seqüências amplificadas, clonadas e seqüenciadas e a seqüência IS900, conclui-se que essas seqüências são verdadeiramente de DNA de MAP.

✓ O limite de detecção da técnica de PCR encontrado no presente estudo foi de 140 a 180UFC/mL de leite, confirmando que a PCR do leite é uma ferramenta valiosa no auxílio do diagnóstico da paratuberculose.

✓ A partir de amostra de leite de um animal que apresentava sinais clínicos semelhantes aos da doença, foram constatados BAAR oriundos de uma colônia observada após processamento e foi amplificado fragmento de tamanho esperado na PCR, indicando que o animal estava infectado por MAP, embora o diagnóstico seja definitivo somente após cultura fecal positiva.

✓ A ocorrência estimada da paratuberculose na região de Viçosa, por meio de PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos IS900/BN1 e IS900/BN2, foi de 3,6%,

fornecendo um primeiro levantamento sobre a doença na região de Viçosa e no estado de Minas Gerais.

✓ O tamanho da amostragem utilizada no estudo não é suficiente para que se tenham dados sobre a prevalência da doença na região de Viçosa e no estado de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACYPRESTE, C. S., et al. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, p. 41-45. 2005.
- ALVAREZ, J., et al. Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. **Veterinary Microbiology**, v.128, n.1-2, Apr 1, p.72-80. 2008.
- AYELE, W. Y., et al. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. **Applied and Environment Microbiology**, v.71, n.3, Mar, p.1210-1214. 2005.
- BEHR, M. A.; KAPUR, V. The evidence for *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.24, n.1, Jan, p.17-21. 2008.
- BORODY, T. J., et al. Anti-mycobacterial therapy in Crohn's disease heals mucosa with longitudinal scars. **Digestive and Liver Disease**, v.39, n.5, May, p.438-444. 2007.
- BULL, T. J., et al. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.7, Jul, p.2915-2923. 2003.
- CHIODINI, R. J.; HERMON-TAYLOR, J. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, n.4, Oct, p.629-631. 1993.
- CHIODINI, R. J., et al. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. **Cornell Veterinarian**, v.74, n.3, Jul, p.218-262. 1984.
- CLARK, D. L., JR., et al. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked

immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, v.91, n.7, Jul, p.2620-2627. 2008.

CLARKE, C. J. Paratuberculosis and molecular biology. **The Veterinary Journal**, v.153, n.3, May, p.245-247. 1997.

COCITO, C., et al. Paratuberculosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, n.3, Jul, p.328-345. 1994.

COLGROVE, G. S., et al. Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal culture. **Veterinary Microbiology**, v.19, n.2, Feb, p.183-187. 1989.

COLLINS, D. M., et al. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. **Veterinary Microbiology**, v.36, n.3-4, Sep, p.289-299. 1993.

COLLINS, M. T. *Mycobacterium paratuberculosis*: A Potential Food-Borne Pathogen? **Journal of Dairy Science**, v.80, p.3445-3448. 1997.

_____. Update on paratuberculosis: I. Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Irish Veterinary Journal**, v.56, n.11, November, p.565-574. 2003.

_____. Update on paratuberculosis: III. Control and zoonotic potential. **Irish Veterinary Journal**, v.57, n.1, January, p.49-52. 2004.

CORTI, S.; STEPHAN, R. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. **BMC Microbiology**, v.2, Jun 26, p.15. 2002.

COTTONE, M., et al. Epidemiology and pathogenesis of Crohn's disease. **Chirurgia Italiana**, v.47, n.5, p.1-7. 1995.

COUSINS, D. V., et al. Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. **Molecular and Cellular Probes**, v.13, n.6, Dec, p.431-442. 1999.

DACORSO FILHO, P., et al. Doença de Johne (Paratuberculose) em bovinos nacionais. **Arquivos do Instituto de Biologia Animal**, v.3, p.129-139. 1960.

DE LISLE, G. W., et al. Bovine paratuberculosis I. A herd study using complement fixation and intradermal tests. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.44, n.2, Apr, p.177-182. 1980.

DRIEMEIER, D., et al. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, n.3/4, jul./dez., p.109-115. 1999.

DUNDEE, L., et al. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, n.3, Sep, p.173-177. 2001.

DUPONT, O. **Jornal do Commercio**, v.5 de novembro, p.8. 1915.

EAMENS, G. J., et al. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. **Veterinary Microbiology**, v.77, n.3-4, Dec 20, p.357-367. 2000.

ELLINGSON, J. L., et al. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. **Journal of Food Protection**, v.68, n.5, May, p.966-972. 2005.

ENGLUND, S., et al. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.209, n.2, Apr 9, p.267-271. 2002.

FELLER, M., et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.7, n.9, Sep, p.607-613. 2007.

FRANCIS, J., et al. Mycobactin, a Growth Factor, for *Mycobacterium johnei*. **Biochemistry Journal**, v. 55, p. 596-607, 1953.

GIESE, S. B.; AHRENS, P. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. **Veterinary Microbiology**, v.77, n.3-4, Dec 20, p.291-297. 2000.

GOMES, M. J. P., et al. Prevalence of infection caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) in dairy herds in Rio Grande do Sul South Brazil. In: **Proceedings of 8th International Colloquium on Paratuberculosis**. Copenhagen, Dinamarca, p.172-173. 2005.

_____. Doença de Johne: isolamento do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) em um rebanho leiteiro infectado na região sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, p.113-118. 2002.

GRANT, I. R. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: the current position. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.6, p.1282-1293. 2005.

GRANT, I. R., et al. Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, n.6, Jun, p.461-465. 1999.

_____. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, May, p.2428-2435. 2002.

GREEN, E. P., et al. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Nucleic Acids Research**, v.17, n.22, Nov 25, p.9063-9073. 1989.

HARRIS, J. E.; LAMMERDING, A. M. Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: current issues. **Journal of Food Protection**, v.64, n.12, Dec, p.2103-2110. 2001.

HAWKEY, P. M. The role of polymerase chain reaction in the diagnosis of mycobacterial infections. **Reviews in Medical Microbiology**, v.5, p.21-32. 1994.

HERMON-TAYLOR, J. Protagonist. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease. **Gut**, v.49, n.6, Dec, p.755-756. 2001.

_____. Treatment with drugs active against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* can heal Crohn's disease: more evidence for a neglected public health tragedy. **Digestive and Liver Disease**, v.34, n.1, Jan, p.9-12. 2002.

IBGE, 2006. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal. Disponível em: http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao_leite/index.php. (Acessado em 5/11/2006).

JAYARAO, B. M., et al. Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.1, n.1, Spring, p.17-26. 2004.

JOHNSON, Y. J., et al. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on milk production in Michigan dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.10, Oct, p.2188-2194. 2001.

KALIS, C. H., et al. Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, n.4, Jul, p.345-351. 1999.

KHARE, S., et al. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead

separation-conventional PCR and real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3, Mar, p.1075-1081. 2004.

KOPECKY, K. E.; LARSEN, A. B. Intravenous johnin and tuberculin tests in cattle vaccinated with *Mycobacterium paratuberculosis* cells and subsequently inoculated with *Mycobacterium bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n.12, Dec, p.1727-1729. 1975.

LAMBRECHT, R. S.; COLLINS, M. T. *Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence mycobactin dependence. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.15, n.3, Mar-Apr, p.239-246. 1992.

LARANJA-DA-FONSECA, L. F., et al. Identificação da presença de anticorpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.66, p.122. 1999.

LARSEN, A. B.; KOPECKY, K. E. Studies on the Intravenous Administration of Johnin to Diagnose Johne's Disease. **American Journal of Veterinary Research**, v.26, May, p.673-675. 1965.

LARSEN, A. B., et al. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n.3, Mar, p.255-257. 1975.

LI, L., et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.35, Aug 30, p.12344-12349. 2005.

LOMBARD, J. E., et al. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, n.5, Sep, p.448-458. 2006.

LOSINGER, W. C. Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. **Journal of Dairy Research**, v.72, n.4, Nov, p.425-432. 2005.

LU, Z., et al. The importance of culling in Johne's disease control. **Journal of Theoretical Biology**, May 16. 2008.

MANNING, E. J. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: a review of current knowledge. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.32, n.3, Sep, p.293-304. 2001.

MANNING, E. J.; COLLINS, M. T. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. **Revue Scientifique et Technique**, v.20, n.1, Apr, p.133-150. 2001.

MERKAL, R. S., et al. Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.190, n.6, Mar 15, p.676-680. 1987.

MILLAR, D., et al. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.9, Sep, p.3446-3452. 1996.

MUNJAL, S. K., et al. Application of different methods for the diagnosis of experimental paratuberculosis in goats. **Zoonoses Public Health**, v.54, n.3-4, p.140-146. 2007.

MUSKENS, J., et al. Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. **Journal of Veterinary Medicine Series B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.50, n.8, Oct, p.372-377. 2003.

NAKAJIMA, M., et al. Diagnóstico da Paratuberculose em Minas Gerais. *In: IV Simpósio Brasileiro em Micobactérias*, Bauru, São Paulo, Trabalho 67. 1991.

NAHMS, 2005. NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. Johne's disease on U.S. dairy operations, Dairy 2002 • United States Department of Agriculture • Animal and Plant Health Inspection Service. February. 2005.

NAHMS, 2008. NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. Johne's Disease on U.S. Dairies, 1991-2007 • United States Department of Agriculture • Animal and Plant Health Inspection Service. April. 2008.

NASER, S. A., et al. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v.364, n.9439, Sep 18-24, p.1039-1044. 2004.

_____. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. **American Journal of Gastroenterology**, v.95, n.4, Apr, p.1094-1095. 2000.

NRCNA, 2003. NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES. Diagnosis and Control of Johne's Disease. Washington, DC: The National Academies Press. 2003.

OIE, 2004. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Listed diseases. Disponível em: http://www.oie.int/eng/maladies/en_classification2007.htm#ListeOIE. (Acessado em 5/6/2007).

OIE, 2006. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00045.htm. (Acessado em 8/7/2006).

OLSEN, I., et al. Elevated antibody responses in patients with Crohn's disease against MPP14, a 14 kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.44, n.3-4, p.287. 2003.

OTT, S. L., et al. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. **Preventive Veterinary Medicine**, v.40, n.3-4, Jun 11, p.179-192. 1999.

PAOLICCHI, F. A., et al. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine Series B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.50, n.1, Feb, p.20-26. 2003.

PAUSTIAN, M. L., et al. Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for diagnosis of Johne's Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.6, Jun, p.2675-2681. 2004.

PILLAI, S. R.; JAYARAO, B. M. Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.5, May, p.1052-1057. 2002.

POESTER, F. P.; RAMOS, E. T. Infecção experimental em caprinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina. **Ciência Rural**, v.24, p.333-337. 1994.

PORTUGAL, M. A. S. C., et al. Ocorrência de paratuberculose no estado de Santa Catarina. **O Biológico**, v.4, n.1/2, p.19-24. 1979.

RAMOS, E. T., et al. Paratuberculose em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v.34, n.6, p.28-32. 1986.

RISTOW, P., et al. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. **The Veterinary Journal**, v.174, n.2, Sep, p.432-434. 2007.

_____. Evaluation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* faecal culture protocols and media. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.1, jan/mar, p.1-4. 2006.

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

ROUSSEL, A. J., et al. Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.230, n.6, Mar 15, p.890-895. 2007.

SAKULA, A. Robert Koch centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. **The Canadian Veterinary Journal**. v.24, Apr. p.127-131. 1983.

SAMBROOK, J., et al. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, v.3. 1989. 215 p.

SANFTLEBEN, P. Quest continues for fast, reliable test for bovine paratuberculosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.197, n.3, Aug 1, p.299-305. 1990.

SANGER, F., et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, n.12, Dec, p.5463-5467. 1977.

SANTOS, J. A.; SILVA, N. L. Sobre a 1ª observação da paratuberculose no Brasil. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, v.24, p.5-14. 1956.

SECHI, L. A., et al. Detection and Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. **American Journal of Gastroenterology**, v.100, n.7, Jul, p.1529-1536. 2005.

SHANAHAN, F.; O'MAHONY, J. The mycobacteria story in Crohn's disease. **American Journal of Gastroenterology**, v.100, n.7, Jul, p.1537-1538. 2005.

SHIN, S. J., et al. Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in culture. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, n.2, Mar, p.116-120. 2004.

SILVA, N. M. Estudos sobre a paratuberculose. **Arquivos do Instituto de Biologia Animal**, v.4, p.169-173. 1961.

SINGH, S. V.; VIHAN, V. S. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goat milk. **Small Ruminant Research**. 2004.

SIVAKUMAR, P., et al. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. **Veterinary Microbiology**, v.108, n.3-4, Jul 1, p.263-270. 2005.

STABEL, J. R. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, n.4, Oct, p.375-380. 1997.

_____. Johne's disease: a hidden threat. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.1, Jan, p.283-288. 1998.

_____. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v.77, n.3-4, Dec 20, p.465-473. 2000.

STABEL, J. R., et al. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.3, Mar, p.525-531. 2002.

STEVENSON, K.; SHARP, J. M. The contribution of molecular biology to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* research. **The Veterinary Journal**, v.153, n.3, May, p.269-286. 1997.

STROMMINGER, B., et al. Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.196, n.1, Mar 1, p.31-37. 2001.

SWEENEY, R. W. Transmission of paratuberculosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.12, n.2, Jul, p.305-312. 1996.

THOREL, M. F., et al. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.40, n.3, Jul, p.254-260. 1990.

TRIPATHI, B. N., et al. Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, johnin and serological tests for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats. **Veterinary Microbiology**, v.116, n.1-3, Aug 25, p.129-137. 2006.

UZOIGWE, J. C., et al. Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. **Epidemiology and Infection**, v.135, n.7, Oct, p.1057-1068. 2007.

WADDELL, L. A., et al. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review. **Canadian Journal of Public Health**, v.99, n.2, Mar-Apr, p.145-155. 2008.

WHAN, L. B., et al. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, n.3, Sep, p.227-231. 2001.

WHIPPLE, D. L., et al. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.3, n.4, Oct, p.368-373. 1991.

WHITLOCK, R. H., et al. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. **Veterinary Microbiology**, v.77, n.3-4, Dec 20, p.387-398. 2000.

APÊNDICES

Apêndice I – Preparo do meio *Herrold Egg Yolk Medium* (HEYM)

O Quadro 4 mostra os reagentes necessários para o preparo de 1L de meio HEYM. Os seis primeiros reagentes foram pesados e dissolvidos por aquecimento em 500ml água destilada. O pH foi ajustado para 6,9 a 7,0 com NaOH 4% e esta solução foi autoclavada a 121°C por 25 minutos. Em seguida, a solução foi resfriada a 56°C e, assepticamente, foram acrescentados a Micobactina *J* (Allied Monitor, Inc.) dissolvida em etanol, as gemas de ovos, a solução de verde malaquita, os antimicrobianos e o restante da água destilada.

O meio HEYM recém preparado foi homogeneizado e distribuído em tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos inclinados até a solidificação do meio e em seguida armazenados a 8°C por no máximo 30 dias.

Para o preparo do meio HEYM sem Micobactina *J* (Allied Monitor, Inc.) foi utilizado o mesmo procedimento, porém a mesma não foi acrescida no meio.

Reagente	Quantidade	
Peptona	9,0	g
Cloreto de Sódio	4,5	g
Extrato de Carne	2,7	g
Glicerol	27,0	mL
Piruvato de Sódio	4,1	g
Agar bacteriológico	15,3	g
Água destilada	870	mL
Micobactina <i>J</i>	2	mL
Etanol P.A.	4	mL
Gemas de ovos ²	120	mL
Verde malaquita	5,1	mL
Vancomicina	20	mg
Ácido nalidíxico	20	mg
Anfotericina B	150	mg

Quadro 4. Reagentes utilizados na preparação de cada litro de meio HEYM

² Os ovos utilizados devem ser frescos, com no máximo dois dias de postura, originados de galinhas que não tenham ingerido alimentos contendo antimicrobianos, visando a não utilização de ovos que contenham essas substâncias. Eles devem ser lavados e imersos em álcool 70% por 30 minutos antes da utilização. Em seguida, devem ser secos com gaze estéril e quebrados assepticamente. A clara deve ser removida por completo e em seguida deve ser feita a remoção da membrana da gema.

Apêndice II – Agrupamento dos resultados obtidos no presente estudo

Animal Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	Controle +
Idade aproximada	3 crias	5 crias	5 crias	2 crias	2 crias	4 crias	1 crias	4 crias	---
Presença de sinais clínicos	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	---
PCR IS900	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR ISMav2	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Clonagem	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Seqüenciamento	+	+	+	---	---	-	-	-	+
ELISA soro	?	-	+	-	+	-	-	-	---
ELISA leite	-	-	-	-	-	-	-	-	---
Cultivo fezes	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Cultivo leite	+	-	-	-	-	-	-	-	+
BAAR	+	-	---	---	---	---	---	---	+

Quadro 5. Agrupamento dos resultados obtidos no presente estudo, para melhor visualização

--- = não se aplica; ? = suspeito