



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**DETECÇÃO DO *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* EM AMOSTRAS DE
LEITE DE BOVINOS NA MICRORREGIÃO DE GARANHUNS, PERNAMBUCO**

PEDRO PAULO FEITOSA DE ALBUQUERQUE

Recife, 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**DETECÇÃO DO *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* EM AMOSTRAS DE
LEITE DE BOVINOS NA MICRORREGIÃO DE GARANHUNS, PERNAMBUCO**

PEDRO PAULO FEITOSA DE ALBUQUERQUE

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciência
Animal Tropical, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro
Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Rinaldo
Aparecido Mota

Recife, 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

Dissertação elaborada por

PEDRO PAULO FEITOSA DE ALBUQUERQUE

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior

Orientador – Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Dra. Elise Miyuki Yamasaki

Pós-Doutoranda - UFRPE

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco

REFLEXÕES

*“Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais*

*Hoje me sinto mais forte
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei*

(Refrão)

***Conhecer as manhas
E as manhãs
O sabor das massas
E das maçãs***

***É preciso amor
Pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir***

*Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente
Compreender a marcha
E ir tocando em frente*

*Como um velho boiadeiro
Levando a boiada
Eu vou tocando os dias
Pela longa estrada, eu vou
Estrada eu sou*

(Refrão)

*Todo mundo ama um dia
Todo mundo chora
Um dia a gente chega
E no outro vai embora*

*Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz*

(Refrão)

*Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais*

*Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz.”*

Tocando em Frente – Amir Sater / Renato Teixeira

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade e toda a ajuda para a realização deste projeto, sem Você comigo nesta caminhada, nada disto teria se realizado. Ainda Te agradeço a oportunidade de, durante o período de dois anos deste projeto, ter conhecido novas pessoas, ter fortalecido laços com as pessoas já conhecidas, e pelas conquistas e sonhos alcançados.

Agradeço aos familiares (a meu querido avô Arcanjo) e amigos (*in memoriam*). Considero rápida a passagem de vocês por minha vida, gostaria de ter passado mais tempo com cada um, mesmo assim, as lembranças da convivência e dos seus feitos estarão comigo, pois já me guiaram bastante e certamente continuará a me ajudar. Tenho muito orgulho e muita saudade de vocês.

Agradeço aos meus pais Francisco Arcanjo e Lúcia de Fátima, muito do que sou hoje foi graças a vocês, obrigado por todos os sacrifícios que fizeram para poder me dar esta vida maravilhosa, tenho uma admiração sem fronteiras por vocês! Agradeço também à minha fraternidade querida composta por dois irmãos maravilhosos, Francisco Edson e Camila Feitosa, vocês são ótimos exemplos do como um bom irmão deve ser. Meus avós (dona Mãezinha, vovô Edson, vovó Eucésia), tios e tias, primos e primas... Todos vocês da minha família significam muito para mim, dedico grande parte desta vitória a vocês, considero-vos meu alicerce, minha motivação! Cada um de vocês está nesta conquista! Amo a todos, sem limites!

Minha namorada Luciana! Obrigado! Sua constante presença, paciência (muita), motivação e apoio me ajudaram muito no decorrer deste mestrado! Amo você. Agradeço também à sua bela família, são ótimos, e fico muito agradecido de poder conviver e conhecê-los melhor!

Agradeço muito a Deus por ter colocado tantos amigos maravilhosos na minha caminhada, amigos de infância, da adolescência, da universidade, do trabalho e da vida! Em especial agradeço aos meus amigos André e Orestes por toda a ajuda na realização deste projeto, vocês são amigos que levarei por toda a minha vida! A presença de todos vocês meus amigos no decorrer deste mestrado me trouxe momentos de paz, muito aprendizado e felicidade. Também vos agradeço pela ajuda na coleta das amostras, processamento e interpretação de resultados! Vocês foram cruciais para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço aos meus orientadores de pesquisa e ao mesmo tempo grandes amigos, ao prof. José Wilton, carinhosamente apelidado de “pai” (risos), ao prof. Rinaldo e ao prof. Leonildo! Obrigado por todos os conselhos, ensinamentos e por toda a paciência que precisaram ter para me orientar!

Agradeço a toda Universidade Federal Rural de Pernambuco (docentes e discentes), ao programa de pós-graduação em Ciência Animal Tropical, ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, e ao Departamento de Medicina

Veterinária por ceder espaço para que eu pudesse realizar este sonho. Admiro muito toda essa instituição, pois foi local de muitas realizações, aprendizado, descobertas e formação para milhares de pessoas, inclusive a minha.

Bem, apesar da tentação, me segurei bastante para não citar nomes, pois, como são muitas as pessoas que contribuíram para esta conquista fiquei preocupado em cometer a injustiça de esquecer alguém! Portanto, vos digo o seguinte: vocês sabem quem são, e o que fizeram para o desenvolvimento desta pesquisa, vos agradeço muito por isso, desde aqueles que demonstravam apenas uma leve preocupação até aqueles que ajudaram a estabelecer um protocolo, todos vocês foram essenciais para a realização deste sonho, sou muito grato e tenho muito orgulho de tê-los em minha vida!

Muito obrigado!

FONTES FINANCIADORAS

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal Tropical.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

1.	QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Etiologia	17
2.2	Epidemiologia	18
2.3	Patogenia e Sinais Clínicos	21
2.4	Métodos de Diagnóstico	24
2.5	Saúde Pública	25
3.	OBJETIVOS	27
3.1.	Geral	27
3.2.	Específicos	27
4.	REFERÊNCIAS	28
5.	ARTIGO CIENTÍFICO	39
5.1	Detecção da região IS900 do <i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>paratuberculosis</i> em amostras de leite bovino em rebanhos foco de paratuberculose no Estado de Pernambuco	40
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	APÊNDICE	55
	ANEXOS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Curva padrão em intervalos de diluição na base 10 para cálculo de eficiência e sensibilidade da qPCR para a região IS900 do MAP	44
-----------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relatos de casos de paratuberculose em bovinos no território brasileiro a partir do ano 2000	19
Tabela 1	A frequência de amostras de leite positivas por propriedade utilizando a PCR convencional e a qPCR com a média de cópias/ml por propriedade determinado pela qPCR	45
Tabela 2	Respectivas amostras positivas na qPCR e na PCR convencional para a região IS900 com os dados da quantificação da qPCR	55

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

MAP – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

ELISA - Ensaio de Imunoadsorção Enzimática

pH - potencial hidrogeniônico

HEYM - Herrold's egg Yolk Medium

IDGA - Imunodifusão em Gel de Ágar

BAAR – Bacilos Álcool Ácidos Resistentes

RESUMO

Objetivou-se com este estudo detectar a região IS900 do MAP em amostras de leite bovino utilizando-se as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) e a PCR convencional, e realizar um estudo de concordância entre os testes utilizados. Foram coletadas 121 amostras de leite bovino de propriedades consideradas foco para o MAP pertencentes à microrregião de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. Das 121 amostras de leite analisadas foi possível detectar o DNA do MAP em 20 (16,52%) amostras na PCR convencional e em 34 (28,09%) na qPCR. O DNA do agente foi detectado em todas as seis propriedades estudadas, variando de 10,00% a 23,81% na PCR convencional e de 10,00% a 36,84% na qPCR. A concordância entre a qPCR e PCR foi moderada ($Kappa = 0,53$; $\chi^2 = 38,08$; $p < 0,000$) e a sensibilidade e especificidade da PCR convencional com relação a qPCR foi de 50% e 96,6%, respectivamente. Conclui-se que o DNA da região IS900 do MAP está presente no leite bovino na região estudada e que a qPCR é uma técnica sensível e rápida para detecção desse agente em amostras de leite.

ABSTRACT

The aim of the present study was to detect the IS900 region of MAP in bovine milk samples using the Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) and conventional PCR, as well as to study the agreement between the tests used. In total, 121 bovine milk samples were collected from properties considered as a focus of MAP in the micro-region of Garanhuns, Pernambuco, Brazil. Of the 121 milk samples analyzed, it was possible to detect the DNA of MAP in 20 samples (16.52%) using conventional PCR and in 34 samples (28.09%) using qPCR. The DNA of the agent was detected on all of the six properties studied, ranging from 10.00% to 23.81% in the conventional PCR and from 10.00% to 36.84% in the qPCR. The agreement between qPCR and conventional PCR was moderate (Kappa =0.53; $\chi^2 = 38.08$; $p < 0.000$). The sensitivity and specificity of conventional PCR in relation to qPCR was 50% and 96.6%, respectively. Based on these results, it was possible to conclude that the IS900 region of MAP is present in bovine milk in the micro-region of Garanhuns, Pernambuco. It was also possible to conclude that the qPCR technique used in the present study was more sensitive than conventional PCR in terms of detecting these bacteria in milk samples.

1 - QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, suplantado apenas pela Índia. Entre 1990 e 2007, a produção de carne bovina dobrou, passando de 4,1 para, aproximadamente, nove milhões de toneladas, com ritmo de crescimento bem superior ao de sua população e consumo. Esta combinação de fatores permitiu que o Brasil se tornasse o maior exportador mundial, ultrapassando a Austrália, a partir de 2004 (SCHLESINGER, 2009).

Estima-se que o estado de Pernambuco possui, aproximadamente, 1.895.642 cabeças de gado bovino; desse total, cerca de 286.216 cabeças pertencem à Microrregião de Garanhuns. Estima-se que a produção de leite no Estado é de 609.056 litros de leite por dia. Dessa produção total, a microrregião é responsável por 84.238 litros de leite produzido diariamente (IBGE, 2012).

Entretanto, apesar de ser uma atividade antiga, diversos problemas relacionados ao manejo prejudicam a criação desses animais, causando grandes prejuízos econômicos aos produtores. Dentre esses problemas os principais são: as doenças infectocontagiosas, distúrbios reprodutivos e manejo nutricional inadequado (VALLE, 2011).

A paratuberculose é uma das importantes enfermidades infectocontagiosas que acomete a espécie bovina. É conhecida também como Doença de Johne, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*. Esta doença causa uma diarreia crônica e intermitente nessa espécie, leva o animal a uma perda progressiva de peso, diminuição na produção do leite e, posteriormente, à morte. (DRIEMEIER et al., 1999; MANNING; COLLINS, 2001; MOTA et al., 2007).

Propriedades com animais positivos para a doença de Johne passam por perdas econômicas provocadas pela queda da produção de leite e pelo aumento de gastos com animais de reposição. Em um estudo realizado nos Estados Unidos, foram avaliadas as perdas econômicas relacionadas à paratuberculose, constatando-se que rebanhos positivos apresentaram prejuízos de quase US\$ 100,00 por vaca quando comparado com rebanhos negativos. Em rebanhos que tiveram 10% de animais abatidos, por apresentarem sinais clínicos, observou-se um prejuízo superior a US\$ 200,00 por animal (OTT et al., 1999). Um decréscimo na produção de leite de até 19,5% foi verificado, em um período de dois anos, em animais que apresentaram a manifestação

clínica da doença. Em animais assintomáticos, esse decréscimo na produção de leiteira chegou até a 16% (BENEDICTUS, 1987; OTT et al., 1999).

No Brasil, a paratuberculose está presente em vários estados (FONSECA et al., 2000; CUNHA et al., 2003; CARVALHO et al., 2008; COSTA et al.; 2010), inclusive no Estado de Pernambuco em que foi relatada a ocorrência da paratuberculose em um rebanho bovino leiteiro, em sua forma clínica e subclínica. Os autores ressaltaram a necessidade de ampliar os estudos sobre essa doença na região, para estimar a extensão do problema e auxiliar, assim, na implantação de medidas sanitárias de controle, a fim de evitar a disseminação do agente responsável por esta enfermidade (MOTA et al., 2007).

A hipótese de que o MAP pode estar envolvido com uma doença inflamatória intestinal humana, a doença de Crohn, já foi levantada há um século e permanece até os dias atuais (DALZIEL, 1913; WAGNER et al., 2013).

Diante do exposto, pesquisas voltadas para a detecção *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* no leite, proveniente da microrregião de Garanhuns, são importantes para fins epidemiológicos e de saúde pública.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Etiologia

Mycobacterium avium subespécie *paratuberculosis* (MAP) é um bacilo, gram-positivo, de crescimento lento, pertencente à família *Mycobacteriaceae*. Esse microorganismo é um patógeno intracelular e possui uma parede rica em lipídeos que é uma característica dessa família, sendo o agente responsável pela Doença de Johne ou Paratuberculose (HARRIS; BARLETTA, 2001; MANNING; COLLINS, 2001).

Estudos realizados por Lovell et al. (1944) indicam que o MAP, mantido ao ar livre, em fezes, pode sobreviver entre 152 e 246 dias, dependendo das condições e que, aparentemente, os solos secos diminuem o período de vida desse microorganismo. Os autores concluíram que, considerando a longevidade do MAP, pastos podem ser considerados como fontes de infecção por pelo menos um ano. Ainda com relação à sobrevivência do MAP em solos, os fatores que podem encurtar o tempo de sobrevivência deste agente são: exposição à luz solar, pH acima de 7,0 e baixo teor de ferro (LARSEN et al., 1956; JOHNSON-IFEARULUNDU; KANEENE, 1990).

As micobactérias, notoriamente, são resistentes a fatores químicos e físicos. O MAP encontra-se entre uma das espécies mais resistentes desse gênero e isso explica a habilidade que esse microorganismo tem de persistir no meio ambiente. Uma característica essencial na epidemiologia dessa enfermidade é que sua resistência ao cloro pode aumentar a sua capacidade de contaminar e sobreviver em sistemas de água (MANNING; COLLINS, 2001; WHAN et al., 2001). Recentemente, foi relatado que o MAP possui a capacidade de esporular, obtendo assim, maior resistência a fatores físicos químicos que possam destruí-los, entretanto, os autores afirmam que ainda não se conhece claramente o mecanismo pelo qual as micobactérias manifestam esse estado (LAMONT et al., 2012).

Uma nova era nas pesquisas sobre a paratuberculose foi anunciada com a descoberta de um elemento genético exclusivo para *M. paratuberculosis*. Esta sequência de nucleotídeos no DNA cromossômico foi descoberto, simultaneamente, em dois laboratórios, sendo denominado de elemento de inserção "IS900", presente no MAP de 15 a 18 cópias. Este foi o primeiro elemento de inserção relatada em micobactérias (COLLINS et al., 1989; GREEN et al., 1989). Outra sequência, utilizada para o diagnóstico da doença de Johne, é a F57, uma sequência única e específica para o MAP

que possui 620 pares de base (POUPART et al., 1993). A *ISMav2* é considerado um elemento de inserção que pode ser encontrada no MAP e não possui nenhuma similaridade a elementos pertencentes a outras micobactérias, essa região foi considerada como uma ótima ferramenta para o diagnóstico do MAP (STROMMINGER et al., 2001).

2.2 - Epidemiologia

O MAP pode causar enfermidades em várias espécies de animais, acometendo, principalmente, os ruminantes e outras espécies como, por exemplo, monogástricos (suínos e cães) e primatas (MCCLURE et al., 1987; MORAVKOYA et al. 2007; GLANEMANN et al. 2008).

Tanto a infecção subclínica do MAP, quanto os casos clínicos da paratuberculose, foram relatados em todos os continentes que têm populações de ruminantes em qualquer sistema de criação (BEHR; COLLINS, 2010).

O primeiro relato da paratuberculose no Brasil, aconteceu no Rio de Janeiro, em 1915, sendo realizado pelo professor Otávio Dupont (DUPONT, 1915) em bovinos que foram importados da Bélgica e, até o ano de 1999, foram relatados mais casos de paratuberculose no território brasileiro: Rio de Janeiro (SANTOS; SILVA, 1956), Rio Grande do Sul (RAMOS et al. 1986; DRIEMEIER et al. 1999), Minas Gerais (NAKAJIMA et al., 1991), Santa Catarina (PORTUGAL et al., 1979) e Mato Grosso de Sul (BRAUTINGAM et al., 1996).

A partir do ano 2000, vários casos de paratuberculose em bovinos foram diagnosticados por diferentes técnicas laboratoriais, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1: Relatos de casos de paratuberculose em bovinos no território brasileiro a partir do ano 2000.

Autores	Ano	Estado	Método de Diagnóstico	Porcentagem de positivos
Fonseca et al.	2000	São Paulo	ELISA	37,9%
Ferreira et al.	2001	Rio de Janeiro	ELISA	18%
Gomes et al.	2002	Rio Grande do Sul	ELISA IDGA	39,8% 11,4%
Cunha et al.	2003	Goiás	Exames clínicos e anátomo-histopatológicos	Relato de caso
Silva	2005	Pará	ELISA	35,4%
Acypreste et al.	2005	Goiás	ELISA	60,24%
Mota et al.	2007	Pernambuco	ELISA Isolamento do MAP presente nas fezes	32,3% 50%
Carvalho	2008	Minas Gerais	Isolamento ELISA PCR IS900 PCR ISMav2 Sequenciamento	Ocorrência estimada de 3,6%
Mota et al.	2009	Paraíba	Exames clínicos e anátomo-histopatológicos e isolamento em HEYM	1,25%
Costa et al.	2010	Espírito Santo	ELISA (11,4% de amostras positivas)	11,4%
Yamasaki et al.	2010	Rio de Janeiro	ELISA Isolamento PCR IS900 Anátomo-histopatológicos	40% 7% 33%
Medeiros et al.	2012	Paraíba	ELISA (Propriedades com histórico) ELISA (Propriedades sem histórico)	70,6% 10,08%
Sá et al.	2013	Pernambuco	ELISA	2,7%

A transmissão do agente da paratuberculose pode ocorrer por várias formas: a ingestão de alimentos e água contaminados por fezes com o MAP; pela amamentação (via tetos contaminados e/ou eliminação direta do microorganismo por meio do leite ou colostro). Vacas infectadas e, provavelmente outras espécies, podem eliminar o MAP diretamente no leite até os estágios finais da infecção (STREETER et al., 1995; SWEENEY et al., 1992; MANNING; COLLINS, 2001).

Já foi constatada a transmissão do agente, da mãe para o feto. Foi afirmado, ainda, que essa transmissão pode ocorrer nos estágios finais da doença e, talvez, mesmo em fases pré-clínicas de infecção (WHITTINGTON; WINDSOR, 2009). A presença do MAP foi relatada em amostras de sêmen e sangue de bovinos naturalmente infectados (MUNSTER et al., 2013).

O MAP é um patógeno obrigatório de animais e o único lugar que ele pode se multiplicar, na natureza, é quando está em um hospedeiro suscetível. No ambiente, o MAP, quando é eliminado através das fezes ou leite, por exemplo, pode sobreviver por longos períodos de tempo no solo e na água, mas é incapaz de multiplicar-se fora do hospedeiro. Consequentemente, a principal fonte de infecção do MAP é o próprio animal infectado (COLLINS, 2003).

Através da inoculação experimental, foi revelado que os animais mais jovens (1,6 a 3 anos) apresentaram uma frequência mais elevada da infecção, quando comparados com animais mais velhos (acima de 8 anos). Ainda, nesse estudo, foi possível observar uma maior eliminação do microorganismo, nas fezes, pelos animais que estavam em idade reprodutiva (HASONOVA et al.; 2009). Os animais mais jovens necessitam de uma carga infecciosa menor quando comparados aos animais mais velhos. Animais adultos são mais resistentes à infecção, mas se tornam suscetíveis, caso haja uma elevada contaminação ambiental (MCKENNA et al., 2006). Leite de vaca cru tem sido foco de vigilância, porque é reconhecido como um fator importante na transmissão do MAP de vaca para bezerro. Resultados de um estudo demonstraram que a fonte de leite e colostro podem ser fatores de risco para a infecção pelo MAP (NIELSEN et al., 2008).

Condições predisponentes para a infecção pelo MAP incluem a falta de higiene, que expõe os bezerros às fezes de animais mais velhos, ao leite contaminado e, também, a uma alimentação inadequada, além da baixa condição corporal. Em bovinos,

a idade do animal o qual é exposto ao MAP, à resistência da raça, susceptibilidade genética e outras doenças têm sido apontados como fatores de risco para o desenvolvimento da paratuberculose (RADOSTITS et al., 2007).

A ocorrência do MAP ainda tem sido relatado em vários produtos e subprodutos de origem animal, demonstrando, assim, que este patógeno encontra-se presente em alimentos fornecidos à população. Exemplo disso foi uma pesquisa realizada na Suíça, onde, de um total de 1384 tanques de leite, foram detectados, em 273 (19,7%) tanques, o elemento de inserção IS900, correspondente ao MAP, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (CORTI; STEPHAN, 2002). Em outro estudo, realizado em Chipre, foi coletado um total de 220 amostras de leite em tanques; dessas, foram detectadas 63 (28,6%) de amostras positivas, usando a técnica de PCR em Tempo Real, para a IS900 e F57 (SLANA et al., 2009).

Já foi constatada a presença do MAP em subprodutos do leite como, por exemplo, amostras de queijos provenientes da Grécia e da República Checa. De 84 amostras, 26 (30,9%) foram positivas na PCR e 3 (3,6%) foram isoladas em cultivo (IKONOMOPOULOS et al., 2005). Além disso, o MAP viável já foi detectado em leite pasteurizado comercial em 2,8%; e o DNA, em 64%, de um total de 702 amostras nos Estados Unidos (ELLINGSON et al., 2005). Foi possível também detectar o DNA do MAP em produtos cárneos em 22% de um total de 77 amostras pela PCR em Tempo Real (KLANICOVA et al., 2011).

2.3 - Patogenia e sinais clínicos

A principal via de infecção do MAP em ruminantes é a digestiva, de modo que a absorção através das superfícies da mucosa é o primeiro passo no processo infeccioso, o que ocorre pelo Tecido Linfoide Associado ao Intestino (GALT), que em ruminantes é organizado em agregados linfoides conhecidos por Placas de Peyer (BEHR; COLLINS, 2010).

As células M presentes nas Placas de Peyer realizam a pinocitose do MAP seguido de transcitose através da célula, que posteriormente serão fagocitados por macrófagos ou células dendríticas (DC) na superfície basolateral (MOMOTANI et al., 1988). Uma vez que o MAP é fagocitado, as células hospedeiras se transportam para

outras áreas do corpo, incluindo a lâmina própria do intestino delgado, os nódulos linfáticos mesentéricos e da circulação periférica (LUGTON, 1999).

Após a fagocitose, o MAP pode permanecer intacto, contrariando os mecanismos bactericidas da célula apresentadora de antígeno (APC), ou podem ser processados e apresentados aos linfócitos T, gerando um efeito em cascata de respostas imunológicas. Como um agente patogênico intracelular, o MAP é capaz de sobreviver dentro de macrófagos, inibindo a maturação do fagossoma; assim, há multiplicação da micobactéria, causando um aumento de volume celular e deslocamento de seus núcleos para os pólos, dispondo os macrófagos em associações ou acúmulos celulares, tomando caráter de célula epitelióide. Então, ocorre a morte dos macrófagos e liberação das bactérias, que, novamente, são fagocitadas, provocando acúmulos de macrófagos, carregados de bactérias nas vilosidades e, posteriormente, nas camadas profundas da lâmina própria, causando, assim, aumento de volume das vilosidades. A lâmina própria desagrega-se e é, em parte, destruída por atrofia (SEFFNER, 1988; BEHR; COLLINS, 2010).

À medida que o agente se multiplica durante semanas ou meses, o intestino, espessado, torna-se menos hábil na absorção de nutrientes e conseqüentemente o animal perde peso apesar de apresentar apetite normal. A parede intestinal espessada começa, gradativamente, a perder eletrólitos do sangue para o intestino. A hipoproteinemia resulta da má absorção e da enteropatia com perda proteica (SMITH, 2006).

A paratuberculose em bovinos é caracterizada por um quadro clínico de diarreia crônica, profusa e refratária ao tratamento com antibióticos. Hipoproteinemia e edema submandibular também são relatados em casos avançados dessa enfermidade. Os animais ainda podem se tornar caquéticos e fracos demais para se levantarem, levando-os, assim, à morte (DRIEMEIER et al., 1999; OTT et al., 1999; MANNING; COLLINS, 2001; MOTA et al., 2007).

A infecção por MAP é dividida em quatro estágios clínicos e, de acordo com a severidade dos sinais clínicos, ocorre à eliminação do agente no meio ambiente e a doença pode ser detectada utilizando métodos correntes de laboratório (BEHR; COLLINS, 2010).

O estágio I possui como característica uma infecção silenciosa, onde MAP se multiplica lentamente na mucosa intestinal (jejuno e íleo) e posteriormente é carregado

aos linfonodos regionais (CLARKE, 1997). Bovinos infectados no estágio I podem disseminar MAP no ambiente pelas fezes, mas normalmente está abaixo dos níveis de detecção por métodos de diagnóstico, incluindo a cultura e a PCR. Caso aconteça a coleta das amostras desses animais, o agente pode ser, ocasionalmente, detectado em concentrações baixas nas suas fezes (WATERS et al., 2003; BEHR; COLLINS, 2010).

O estágio II, também conhecido por “infecção subclínica”, tem como característica uma concentração mais elevada de MAP na mucosa intestinal, mas esses animais não apresentam perda de peso ou diarreia, mas, possuem uma resposta imune maior com aumento nos títulos de anticorpos contra o MAP. Nessa fase, já é possível a detecção do MAP nas fezes com testes convencionais. De certa forma, os animais nesse estágio contribuem para a disseminação do agente, contaminando assim o ambiente, e pode ser considerado como fonte de infecção para os outros animais do rebanho (BASSEY; COLLINS, 1997; BEHR; COLLINS, 2010).

No estágio III, os animais já apresentam a clínica, caracterizado por perda de peso gradual e diarreia. A população de MAP, dentro das células da mucosa intestinal, é muito elevada e a capacidade de absorção está bastante reduzida, associada a uma enteropatia com perda de proteínas. Os sinais vitais como frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura apresentam-se normais. Há também uma diminuição na produção de leite. Nessa fase, quase todos os animais são positivos para os testes de diagnóstico (BEHR; COLLINS, 2010).

O estágio IV é o mais avançado, e corresponde à fase em que os animais estão fracos, caquéticos e, geralmente, têm diarreia profusa crônica. Edema intermandibular é característico desta fase da doença. A maioria dos animais é enviada para abate neste ponto. Caso contrário, a morte ocorre como um resultado da desidratação e caquexia (BEHR; COLLINS, 2010).

Muitas lesões podem ser observadas na necropsia, dependendo da fase da infecção e das espécies em questão. As lesões clássicas, descritas nos casos em bovinos, incluem um íleo ondulado e espessado, com gânglios linfáticos mesentéricos edematosos e aumentados de volume com a observação também de linfangiectasia. As principais lesões microscópicas incluem enterite, linfadenite e linfangite granulomatosas que se caracterizam por infiltrado inflamatório composto por macrófagos, células

epitelióides e células gigantes de Langhans com a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BUERGELT et al., 1978; DRIEMEIER et al., 1999; MOTA et al., 2007).

2.4 – Métodos de diagnóstico

Para detecção dos bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) do MAP, pode-se utilizar métodos de coloração como a coloração de Ziehl-Neelsen, sendo possível a observação desse microrganismo em amostras de fezes ou tecidos (MANNING; COLLINS, 2001).

Pode-se também fazer uso de meios de culturas para o isolamento do MAP, é um método altamente específico, mas é dispendioso e, geralmente, requer de 8 a 16 semanas de incubação para o crescimento de colônias visíveis em meios sólidos. É difícil determinar a sensibilidade da cultura, mas é considerado o método padrão para diagnóstico dessa enfermidade. Diferentes meios seletivos e não seletivos, contendo micobactina, podem ser utilizados para o isolamento de MAP, como o Lowenstein-Jensen, o meio Herrold's egg yolk, Middlebrook 7H11, ou meio de Dubos (SAXEGAARD, 1985; MANNING; COLLINS, 2001; de JUAN et al., 2005; SLANA et al., 2008).

Uma característica importante de qualquer protocolo de cultura para o MAP é a sua capacidade para prevenir o crescimento de contaminantes que podem estar presentes numa amostra. No meio sólido, as colônias de MAP podem não ficar visíveis entre as colônias de outros microorganismos, mas, por vezes, o MAP ainda pode ser detectado pela PCR (SECOTT et al., 1999; WHITTINGTON, 2009). Entretanto, apesar das medidas adequadas de descontaminação, as culturas são, muitas vezes, perdidas por causa da contaminação (VARY et al., 1990).

Foi relatado que a sensibilidade da PCR para amostras fecais é equivalente ao da cultura, com uma maior especificidade, devido aos *primers* utilizados para evitar a detecção de bactérias ambientais (KAWAJI et al., 2007).

Para a detecção do MAP, o gene alvo mais utilizado é a região IS900, que foi descrita pela primeira vez por Green et al. (1989), mas também foi descoberto, independentemente, por Collins et al. (1989), e foi utilizado pela primeira vez como um alvo numa PCR de diagnóstico por Vary et al. (1990). Alguns dos estudos mais citados,

onde a PCR convencional foi aplicada em pesquisa para o MAP, incluem investigações sobre a presença do MAP em tecidos de pacientes com a doença de Crohn (MOSS et al., 1992; SANDERSON et al., 1992) e pesquisa de leite no varejo (MILLAR et al., 1996).

A PCR em Tempo Real oferece uma abordagem muito eficiente para a detecção de agentes patogênicos microbianos e, quando comparado com a PCR convencional o método possui determinadas vantagens, como: o potencial para quantificação do agente, risco mínimo de contaminação cruzada, uma maior sensibilidade e a especificidade que é reforçada pela utilização de sondas (MACKAY, 2004).

A técnica de Imuno-histoquímica também tem sido utilizada para a detecção do MAP em animais acometidos, obtendo-se resultados mais sensíveis quando comparado com o isolamento em meios de cultura (THORESEN et al., 1994).

Testes sorológicos são utilizados para diagnóstico da infecção ou confirmação da doença, tais como: Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), ELISA e Fixação do Complemento (FC). O IDGA pode ser útil para a confirmação de casos clínicos, entretanto as taxas de sensibilidade e especificidade foram insatisfatórias para diagnóstico subclínico da paratuberculose (FERREIRA et al., 2002). O teste de Fixação do Complemento demonstrou ser menos eficiente na detecção de infecção subclínica para tuberculose, quando comparado com o ELISA, pois este último foi capaz de detectar anticorpos em estágio mais inicial da infecção quando comparado com o FC (YOKONIZO et al., 1991).

2.5 – Saúde Pública

Um dilema para o controle da paratuberculose é se o MAP é estritamente um patógeno de animais ou se também é um agente que pode causar infecções no homem, sendo associado à etiologia da doença de Crohn. A hipótese de que o MAP pode causar doença inflamatória intestinal humana remonta há um século (DALZIEL, 1913), e o interesse na associação do MAP com a doença de Crohn foi estimulado por uma revisão do assunto realizada por Chiodini (1989).

A Doença de Crohn é uma inflamação crônica do intestino que afeta principalmente o íleo. A resposta inflamatória granulomatosa transmural no íleo é

indicativo de doença de Crohn e há uma considerável semelhança entre a histopatologia do intestino de bovinos (doença de Johne), causada pelo MAP (COLLINS, 1997).

São várias as evidências de que o MAP pode estar envolvido, de alguma forma, com o desenvolvimento da doença de Crohn. Dell'isola et al. (1994) detectaram o DNA do MAP, por meio da PCR, em crianças com a doença de Crohn. Naser et al. (2000) isolaram o MAP em leite materno de pacientes com a doença de Crohn. Além disso, Naser et al. (2004), conseguiram o isolamento e a detecção do DNA do MAP no sangue de pessoas com a doença de Crohn. De 28 pacientes, conseguiu-se a cultura de MAP em 14 deles.

Biopsia também tem sido utilizada para investigar a presença do MAP em intestino, Bull et al. (2003) pela PCR para IS900 detectaram o MAP em 34 de 37 (92%) pacientes com a Doença de Crohn contra 9 de 34 (26%) de pacientes sem essa enfermidade.

Lesões na mucosa oral já foram relatadas em mais de 40% dos pacientes com doença de Crohn (PITTOCK et al., 2001; HARTY et al., 2005). Um estudo que utilizou biópsias da mucosa oral de pacientes com a doença de Crohn conseguiu detectar o DNA da região IS900 do MAP em oito pacientes de um total de 23. Os autores identificaram uma associação significativa entre o MAP e essas lesões orais (MOLICOTTI et al., 2013).

Caso os seres humanos possam ser infectados com MAP, são vários os modos de transmissão possíveis, incluindo a transmissão entre humanos. No entanto, como os animais são a fonte de infecção principal do agente, a transmissão, a partir dos animais para os humanos, seria a mais provável (COLLINS, 1997).

Se existe algum tipo de associação, não necessariamente causal, entre o MAP e, pelo menos alguns casos da doença de Crohn, então, existem evidências suficientes de domínio público, indicando que o leite é uma potencial fonte de transmissão de microorganismos viáveis de bovinos para humanos, mesmo após a pasteurização (ELLINGSON et al., 2005; GRANT, 2005).

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

- Detectar a presença de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* em amostras de leite bovino proveniente da Microrregião de Garanhuns, Estado de Pernambuco.

3.2 - Objetivos específicos

- Detectar a região IS900 do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em amostras de leite de rebanhos bovinos leiteiros por meio da técnica da PCR Convencional e a PCR em Tempo Real.
- Comparar as técnicas da PCR convencional e PCR em tempo real para a detecção de MAP em amostras de leite.

4 - REFERÊNCIAS

- ACYPRESTE C. S.; JULIANO R. S.; RIVEIRA F. E. B.; SILVA L. A. F.; FIORAVANTI M. C. S.; DIAS-FILHO F. C. (2005) Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação. **Ciência Animal Brasileira**, 6(1):55-59.
- BASSEY, E. O.; COLLINS, M. T. (1997) Study of Tlymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infected cattle. **Infection and Immunity**, 65:4869–4872.
- BEHR, M. A.; COLLINS, D. M. (2010) Paratuberculosis : organism, disease, control. **CAB International**.
- BENEDICTUS, G.; DIJKHUIZEN, A. A.; STELWAGEN, J. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. (1987) **Veterinary Record**, 121:142-146.
- BIET, F.; BAY, S.; THIBAUT, V. C.; EUPHRASIE, D.; GRAYON, M.; GANNEAU, C.; LANOTTE, P.; DAFFÉ, M.; GOKHALE, R.; ETIENNE, G.; REYRAT, J. M. (2008) Lipopeptide induces a strong host humoral response and distinguishes *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from *M. avium* subsp. *avium*. **Vaccine**, 26: 257-268.
- BRAUTINGAM F. E.; GLASS R.; MENDY W. (1996) Levantamento sorológico utilizando a técnica de ELISA para paratuberculose em cinco rebanhos de corte do Mato Grosso do Sul e quatro de leite do Estado de São Paulo. **15º Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**, Campo Grande, MS, 271 p.
- BUERGELT, C. D.; POOL, M. O.; WILLIAMS, E. (1978) Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. **Veterinary Pathology**, 15:196-207.
- BULL, T. J.; McMINN, E. J.; SIDI-BOUMEDINE, K.; SKULL, A.; DURKIN, D.; NEILD, P.; RHODES, G.; PICKUP, R.; HERMON-TAYLOR, J. (2003) Detection and verification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(7):2915-2923.
- CARVALHO I. A. (2008) **Isolamento e detecção molecular de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) em rebanhos bovinos leiteiros na região de Viçosa, MG**. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, UFV, Viçosa.

- CHIODINI, R. J. (1989) Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. **Clinical Microbiology Reviews**, 2:90–117.
- CLARKE, C. J. (1997) The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. **Journal of Comparative Pathology**, 116:217–261.
- COLLINS M. T. (1997) Mycobacterium paratuberculosis: a potential food-borne pathogen? **Journal of Dairy Science**, 80:3445–3448.
- COLLINS, D. M., GABRIC, D. M. DE LISLE, G. W. (1989) Identification of a repetitive DNA sequence specific to Mycobacterium paratuberculosis. **FEMS Microbiology Letters**, 60:175–178.
- COLLINS, M. T. (2003) Update on paratuberculosis: Epidemiology of Johne's disease and the biology of Mycobacterium paratuberculosis. **Irish Veterinary Journal**, 56:565–574.
- CORTI, S.; STEPHAN, R. (2002) Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. **BMC Microbiology**, 2:15.
- COSTA, J. C. M.; PIERI, F. A.; SOUZA, C. F.; ESPESCHIT, I. F.; FELIPPE, A. G.; SANTOS, G. M.; TOBIA, F. L.; SILVA JR. A.; MOREIRA, M. A. S. (2010) Levantamento sorológico de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 62(6):1491-1494.
- CUNHA P. H. J.; MARTINS A. F.; FIORAVANTI M. C. S.; BRITO L. A. B.; ARAÚJO E. G.; SILVA L. A. F.; RABELO R. E.; JARDIM E. A. G. V. (2003) Avaliação microbiológica e anatomopatológica da paratuberculose bovina: relato de caso. **Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Botucatu**, 118 p.
- DALZIEL, T. K. (1913) Chronic interstitial enteritis. **British Medical Journal**, 1068–1070 p.
- DE JUAN, L., MATEOS, A., DOMÍNGUEZ, L., SHARP, J.M. AND STEVENSON, K. (2005) Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, 106:249–257.

DELL'ISOLA, B.; POYART, C.; GOULET, O.; MOUGENOT, J. F.; SADOUN-JOURNO, E.; BROUSSE, N.; SCHMITZ, J.; RICOUR, C.; BERCHE, P. (1994) Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by polymerase chain reaction in children with Crohn's disease. **Journal of Infectious Diseases**, 169:449-451.

DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. E. F.; GOMES, M. J. P.; CORBELLINI, L. G.; LORETTI, A. P.; COLODEL, E. M. (1999) Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 19(3/4):09-115.

DUPONT O. Data: 5.11.1915. **Jornal do Comércio do Rio de Janeiro**.

ELLINGSON, J. L. E.; ANDERSON, J. L.; KOZICZKOWSKI, J. J.; RADCLIFF, R. P.; SLOAN, S. J.; ALLEN, S. E.; SULLIVAN, N. M. (2005) Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. **Journal of Food Protection**, 68:966-972.

FERREIRA R.; FONSECA L. S.; LILENBAUM W. (2001) Detection of anti-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antibodies in Brazilian herds. **Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis**. 463-464 p.

FERREIRA, R.; FONSECA, L. S.; LILENBAUM, W. (2002) Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, 35(3):173-175.

FONSECA L. F.; OLIVAL A. A.; PEREIRA C. C.; HEINEMANN M.B.; RICHTZENHAIN L.J.; SANTOS M.V. (2000) Identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, 28:51-56.

GLANEMANN, B.; SCHÖNENBRÜCHER, H.; BRIDGER, N.; ABDULMAWJOOD, A.; NEIGER, R.; BÜLTE, M. (2008) Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis*-specific DNA by PCR in intestinal biopsies of dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 22(5):1090-1094.

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

GRANT, I. R. (2005) Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. **Journal of Applied Microbiology**, 98(6):1282–1293.

GREEN, E. P.; TIZARD, M. L. V.; MOSS, M. T.; THOMPSON, J.; WINTERBOURNE, D. J.; MCFADDEN, J. J.; HERMON-TAYLOR, J. (1989) Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Nucleic Acids Research**, 17:9063–9073.

HARRIS, N. B.; BARLETTA, R. G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. **Clinical Microbiology Reviews**, 14(3):489-512.

HARTY, S.; FLEMING, P.; ROWLAND, M.; CRUSHELL, E.; MCDERMOTT, M.; DRUMM, B.; BOURKE, B. (2005) A prospective study of the oral manifestations of Crohn's disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 3(9):886-891.

HASONOVA, L.; TRCKA, I.; BABAK, V.; ROZSYPALOVA, Z.; PRIBYLOVA, R.; PAVLIK, I. (2009) Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissues of naturally infected cattle as affected by age. **Veterinarni Medicina**, 54(6):257–269.

IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>> Acesso em 06/01/2014.

IFCN – **International Farm Comparison Network**. 2012. Disponível em: <<http://www.ifcdairy.org/media/bilder/inhalt/News/DR2012/IFCN-Dairy-Report-2012-press-release-corrected.pdf>> Acessado em 06/01/14.

IKONOMOPOULOS, J.; PAVLIK, I.; BARTOS, M.; SVASTOVA, P.; AYELE, W. Y.; ROUBAL P.; LUKAS, J.; COOK N.; GAZOULI M. (2005) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, 71(12):8934–8936.

JOHNSON-IFEARULUNDU Y.; KANEENE J.B. (1990) Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. **American Journal of Veterinary Research**, 60:589-596.

- KAWAJI, S.; TAYLOR, D. L.; MORI, Y.; WHITTINGTON, R. J. (2007) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. **Veterinary Microbiology**, 125:36–48.
- KLANICOVA, B.; SLANA, I.; VONDRUSKOVA, H.; KAEVSKA, M.; PAVLIK, I. (2011) Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subspecies in meat products. **Journal of Food Protection**, 74(4):522-690.
- LAMONT, E. A.; BANNANTINE, J. P.; ARMIE'S, A.; ARIYAKUMAR, D. S.; SREEVATSAN, S. (2012) Identification and characterization of a spore-Like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis* cultures. **Plos One**, 7(1), e30648.
- LARSEN A. B., MERKAL R.S.; VARDAMAN T. H. (1956) Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, 549-551 p.
- LOVELL R.; LEVI M.; FRANCIS J. (1944) Studies on the survival of Johne's bacilli. **Journal of Comparative Pathology**, 54:120-129.
- LUGTON, I. (1999) Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. **Immunology and Cell Biology**, 77:364–372.
- MACKAY, I. M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, 10:190– 212.
- MANNING, E. J. B.; COLLINS, M. T. (2001) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Épizooties**, 20:133-150.
- MCCLURE, H. M.; CHIODINI, R. J.; ANDERSON, D. C.; SWENSON, R. B.; THAYER, W. R.; COUTU, J. A. (1987) *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of Stumptail Macaques (*Macaca arctoides*). **The Journal of Infectious Diseases**, 155:1011-1019.
- MCKENNA, S. L.; KEEFE, G. P.; TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J.; BARKEMA, H.W. (2006) Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. **Canadian Veterinary Journal**, 47:1089–1099.

- MEDEIROS J. M. A.; GARINO-JÚNIOR F.; MATOS R. A. T.; COSTA V. M. M.; RIET-CORREA F. (2012) Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(8):697-700.
- MILLAR, D.; FORD, J.; SANDERSON, J.; WITHEY, S.; TIZARD, M., DORAN, T.; HERMON-TAYLOR, J. (1996) IS900 to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England and Wales. **Applied and Environmental Microbiology**, 62:3446–3452.
- MOLICOTTI, P.; SCANU, A. M.; LUMBAU, A.; CANNAS, S.; BUA, A.; LUGLIÈ, P.; ZANETTI, S. (2013) Molecular identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in oral biopsies of Crohn's disease patients. **Gut Pathogens**, 5:18.
- MOMOTANI, E.; WHIPPLE, D. L.; THIERMANN, A. B.; CHEVILLE, N. F. (1988) Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. **Veterinary Pathology**, 25:131–137.
- MORAVKOVA, M.; BARTOS, M.; DVORSKA-BARTOSOVA, L.; BERAN, V.; PARMOVA, I.; OCEPEK, M.; PATE, M.; PAVLIK I. (2007) Genetic variability of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* of pig isolates. **Veterinarni Medicina**, 52(10):430–436.
- MOSS, M. T.; SANDERSON, J. D.; TIZARD, M. L. V.; HERMON-TAYLOR, J.; EL-ZAATARI, F. A. K.; MARKESICH, D. C.; GRAHAM, D. Y. (1992) Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* in long-term cultures from Crohn's disease and control tissues. **Gut**, 33:1209–1213.
- MOTA P. M. P. C.; PIRES P. S.; ASSIS R. A.; SALVARANI F. M.; LEITE R. M. H.; DIAS L. D.; LEITE R. C.; LOBATO F. C. F.; GUEDES R. M. C.; LAGE A. P. (2009) Paratuberculosis in a dairy Gyr herd in a state of Paraíba, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(9):703-706.
- MOTA R. A.; PINHEIRO-JUNIOR J. W.; GOMES M. J. P.; PEIXOTO R. M.; MAIA C. L.; BRITO M. F.; CHIES J. A. B.; SNEL G. G. M.; BERCHT S.; JUFFO G. D. (2007) Paratuberculose em um rebanho leiteiro no Estado de Pernambuco, PE. **Arquivos do Instituto Biológico**, 74(2):73-79.

MUNSTER, P.; VOŁKEL, I.; WEMHEUER, W.; SCHWARZ, D.; DOŘRING, S.; CZERNY, C. P. (2013) A Longitudinal Study to Characterize the Distribution Patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Semen, Blood and Faeces of a Naturally Infected Bull by IS900 Semi-Nested and Quantitative Real-Time PCR. **Transboundary and Emerging Diseases**, 60:175–187.

NAKAJIMA M.; MAIA F. C. L.; MOTA P. M. P. C. (1991) Diagnóstico da paratuberculose em Minas Gerais. **4º Simpósio Brasileiro em Micobactérias**, Bauru, SP, 67 p.

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

NASER, S. A.; SCHWARTZ, D.; SHAFRAN, I. (2000) Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. **American Journal of Gastroenterology**, 95:1094-1095.

NIELSEN, S. S.; BJERRE, H.; TOFT, N. (2008) Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 91:4610–4615.

OTT, S. L.; WELLS, S. J.; WAGNER, B. A. (1999) Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. **Preventive Veterinary Medicine**, 40:179-192.

PITTOCK, S.; DRUMM, B.; FLEMING, P.; MCDERMOTT, M.; IMRIE, C.; FLINT, S.; BOURKE, B. (2001) The oral cavity in Crohn's disease. **Journal of Pediatrics**, 138(5):767-771.

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

POUPART, P.; COENE, M.; HEUVERSWYN, H. V.; COCITOI, C. (1993) Preparation of a Specific RNA Probe for Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and Diagnosis of Johne's Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, 31(6):1601-1605.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. (2007) Diseases associated with bacteria. In: RODENHUIS, J.; BALL, E. *Veterinary Medicine: Diseases associated with bacteria*.

a Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. ed.10th. **Saunders Elsevier**, 1017–1044 p.

RAMOS E. T., POESTER F. P., CORREA B. L., OLIVEIRA S. J., RODRIGUES N. C.; CABARRO C. E. (1986) Paratuberculose em bovinos no Estado de Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, 6(34):28-32..

SÁ, L. M.; OLIVEIRA, J. M. B.; SANTOS, G. R.; BRANDESPIM, D. F.; DA SILVA JÚNIOR, J. L.; MOTA, R. A.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. (2013) Avaliação sorológica e de fatores de risco para a infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em rebanhos leiteiros da Microrregião de Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(3):310-314.

SANDERSON, J. D.; MOSS, M. T.; TIZARD, M. L. V.; HERMON-TAYLOR, J. (1992) *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. **Gut**, 33:890–896.

SANTOS J. A.; SILVA N. I. (1956) Sobre a 1ª observação de paratuberculose no Brasil. **Boletim Da Sociedade Brasileira De Medicina Veterinária**, 24:5-14.

SAXEGAARD, F. (1985) Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes of goats by use of selective Dubos medium. **Journal of Clinical Microbiology**, 22:312–313.

SCHLESINGER, S. (2009) O Gado Bovino no Brasil. **Heinrich Böll Stiftung – América Latina**. Disponível em: http://www.boell-latinoamerica.org/downloads/texto_gado_boll_2009-4.pdf acessado em 10/07/2012.

SECOTT, T. E.; OHME, A. M.; BARTON, K. S.; WU, C. C.; ROMMEL, F.A. (1999) *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bovine feces is improved by coupling agar culture enrichment to an IS900-specific polymerase chain reaction assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 11:441–447.

SEFFNER, W. (1988) Paratuberculose. In: Doenças infecciosas em animais domésticos. São Paulo: **Roca**, 286-289 p.

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

SLANA I.; LIAPI M.; MORAVKOVA M.; KRALOVA A.; PAVLIK I. (2009) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow bulk tank milk in Cyprus detected by culture and quantitative IS900 and F57 real-time PCR. **Preventive Veterinary Medicine**, 89:223–226.

SLANA, I.; PAOLICCHI, F.; JANSTOVA, B.; NAVRATILOVA, P.; PAVLIK, I. (2008) Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. **Veterinarni Medicina**, 53:283–306.

SMITH, B. P. (2006) **Medicina Interna de Grandes Animais**. Manole, ed.3, Barueri, SP, 779-783 p.

STREETER, R. N.; HOFFSIS, G. F.; BECH-NIELSEN, S; SHULAW, W. P.; RINGS, D. M. (1995) - Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. **American Journal of Veterinary Research**, 56(10):1322-1324.

STROMMENGER, B.; STEVENSON, K.; GERLACH, G.F. (2001) Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, 196(1):31–37.

SWEENEY R. W.; WHITLOCK R. H.; ROSENBERGER A. E. (1992). - *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. **Journal of Clinical Microbiology**, 30:166-171.

THORESEN, O. F.; FALK, KNUT.; EVENSEN, Ø. (1994) Comparison of Immunohistochemistry, Acid-Fast Staining, and Cultivation for Detection of *Mycobacterium Paratuberculosis* in Goats. **J Vet Diagn Invest**, 6:195-199.

VALLE, E. R. (2011). **EMBRAPA: Boas Práticas Agropecuárias – Bovinos de Corte – Manual de Orientações**. Disponível em: <http://bpa.cnpqc.embrapa.br/material/MANUAL_de%20BPA_NACIONAL.pdf> Acesso em: 30/07/2012.

VARY, P. H.; ANDERSEN, P. R.; GREEN, E.; HERMON-TAYLOR, J.; MCFADDEN, J.J. (1990) Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, 28:933–937.

VERDIER, J.; DEROCHE, L.; ALLEZ, M.; LOY, C.; BIET, F.; BODIER, C. C.; BAY, S.; GANNEAU, C.; MATYSIAK-BUDNIK, T.; REYRAT, J. M.; HEYMAN, M.; CERF-BENSUSSAN, N.; RUEMMELE, F. M.; MENARD, S. (2013) Specific IgG Response against *Mycobacterium avium paratuberculosis* in Children and Adults with Crohn's Disease. **Plos One**, 8(5), e62780.

WAGNER, J.; SKINNER, N. A.; CATTO-SMITH, A. G.; CAMERON, D. J. S.; MICHALSKI, W. P.; VISVANATHAN, K.; KIRKWOOD, C. D. (2013) LR4, IL10RA, and NOD2 mutation in paediatric Crohn's disease patients: An association with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and TLR4 and IL10RA expression. **Medical Microbiology and Immunology**, 202(4):267-276.

WATERS, W. R.; MILLER, J. M.; PALMER, M. V.; STABEL, J. R.; JONES, D. E.; KOISTINEN, K. A.; STEADHAM, E. M.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C.; BANNANTINE, J. P. (2003) Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. **Infection and Immunity**, 71:5130–5138.

WHAN, L. B., GRANT, I. R., BALL, H. J., SCOTT, R. AND ROWE, M. T. (2001) Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. **Letters in Applied Microbiology**, 33:227–231.

WHITTINGTON, R. (2009) Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from faecal and tissue samples in a liquid culture medium. **Journal of Clinical Microbiology**, 47:614–622.

WHITTINGTON, R. J.; WINDSOR, P. A. (2009) In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. **The Veterinary Journal**, 179:60–69.

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

YOKOMIZO, Y.; KISHIMA, M.; MORI, Y.; NISHIMORI, K. (1991) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation test for

the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 53(4):577-584.

5 - ARTIGO CIENTÍFICO

5.1 - ARTIGO 1

DETECÇÃO DA REGIÃO IS900 DO *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO EM REBANHOS FOCO DE PARATUBERCULOSE NO ESTADO DE PERNAMBUCO.

(Artigo a ser submetido ao periódico Tropical Animal Health and Production)

DETECÇÃO DA REGIÃO IS900 DO *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO EM REBANHOS FOCO DE PARATUBERCULOSE NO ESTADO DE PERNAMBUCO.

Resumo: Objetivou-se com este estudo detectar a região IS900 do MAP em amostras de leite bovino utilizando-se as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) e a PCR convencional, e realizar um estudo de concordância entre os testes utilizados. Foram coletadas 121 amostras de leite bovino de propriedades consideradas foco para o MAP pertencentes à microrregião de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. Das 121 amostras de leite analisadas foi possível detectar o DNA do MAP em 20 (16,52%) amostras na PCR convencional e em 34 (28,09%) na qPCR. O DNA do agente foi detectado em todas as seis propriedades estudadas, variando de 10,00% a 23,81% na PCR convencional e de 10,00% a 36,84% na qPCR. A concordância entre a qPCR e PCR foi moderada ($Kappa = 0,53$; $\chi^2 = 38,08$; $p < 0,000$) e a sensibilidade e especificidade da PCR convencional com relação a qPCR foi de 50% e 96,6%, respectivamente. Conclui-se que o DNA da região IS900 do MAP está presente no leite bovino na região estudada e que a qPCR é uma técnica sensível e rápida para detecção desse agente em amostras de leite.

Palavras-chave: Biologia molecular, diagnóstico, paratuberculose, leite.

Introdução

Mycobacterium avium subespécie *paratuberculosis* (MAP) é um bacilo, Gram-positivo, de crescimento lento, pertencente à família *Mycobacteriaceae*. Esse microorganismo é um patógeno intracelular e possui uma parede rica em lipídeos que é uma característica dessa família; esta bactéria é responsável pela Doença de Johne ou Paratuberculose (Harris & Barletta, 2001; Manning & Collins, 2001).

A paratuberculose já foi relatada em diversos estados brasileiros (Yamasaki et al., 2013). Em Pernambuco, sua ocorrência foi descrita em um rebanho bovino leiteiro pelos sinais clínicos, histopatologia, sorologia pelo ELISA (32,3% de amostras positivas), isolamento (50% de amostras positivas) e PCR (Mota et al., 2007). Já na microrregião de Garanhuns, foi realizado um estudo de prevalência que detectou 2,7% (11/408) de amostras positivas e 47,4% (9/19) de propriedades focos (Sá et al., 2013).

Os métodos de diagnóstico mais comuns para identificação de animais infectados por MAP incluem o isolamento da bactéria das fezes utilizando meios de culturas seletivos e técnicas para detectar anticorpos como o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Entretanto, a maior desvantagem da utilização dos meios de cultura são os longos períodos de incubação, que pode chegar a 16 semanas para uma identificação definitiva, já o ELISA pode ser realizado em poucas horas, mas possui uma sensibilidade estimada em 45%, porque os anticorpos contra o MAP podem não ser detectados nos estágios iniciais da infecção (Collins, 1996; O'Mahony & Hill 2004).

A técnica molecular como a PCR é um método rápido e qualitativo para a detecção do MAP, mas quando a PCR convencional é comparada com a PCR em Tempo Real (qPCR) esta última possui uma maior sensibilidade e pode determinar a carga infectante em amostras ambientais, fezes, leite e em culturas (O'Mahony and Hill 2004; Kawaji, et al. 2007). Um dos genes alvo utilizado para detecção do MAP na PCR é a região IS900, que foi descrito pela primeira vez por Green et al. (1989), mas também foi isolado independentemente por Collins et al. (1989). A descoberta da região IS900 no MAP possibilitou o diagnóstico da paratuberculose em estágios iniciais da infecção. A especificidade e sensibilidade da PCR foi aprimorada até detectar 1 UFC do MAP em amostras (Vansnick et al. 2004).

O MAP tem sido relatado em vários produtos e subprodutos de origem animal. Pesquisa realizada na Suíça detectou a presença da região IS900 em 19,7% (273/1384) amostras de leite procedentes de tanques (Corti and Stephan, 2002). Em outro estudo realizado no Chipre, foi coletado um total de 220 amostras de leite em tanques, dessas foram detectados 63 (28,6%) amostras positivas usando a técnica de PCR em Tempo Real para a IS900 e F57 (Slana et al. 2009). Além disso, já foi constatada a presença do MAP em subprodutos do leite como amostras de queijos provenientes da Grécia e da República Checa, de 84 amostras 26 (30,9%) foram positivas na PCR e 3 (3,6%) foram isoladas em cultivo (Ikonopoulou et al. 2005). O MAP viável já foi detectado em leite pasteurizado comercial em 2,8% e o DNA em 64% de um total de 702 amostras nos Estados Unidos (Ellingson et al. 2005).

Objetivou-se neste estudo pesquisar a região IS900 do MAP em amostras de leite bovino pertencentes à microrregião de Garanhuns, Pernambuco, utilizando-se as

técnicas PCR e qPCR, além de realizar um estudo de concordância entre estes testes de diagnóstico.

Material e Métodos

Amostragem

Um total de 121 amostras de leite bovino foram coletadas, estas foram procedentes de seis rebanhos leiteiros considerados focos da infecção do MAP através do teste sorológico ELISA realizado em propriedades rurais localizadas na microrregião de Garanhuns, Pernambuco (Sá, et al. 2013). No momento da coleta os animais estavam clinicamente saudáveis.

Coleta e Processamento das Amostras

Obtenção do Leite

Amostras de leite foram obtidas após a limpeza dos tetos com água e desinfecção com álcool 70%. Os três primeiros jatos de leite foram descartados e logo em seguida foi coletado aproximadamente 50mL de leite em *pool* dos quatro quartos mamário em tubos de polipropileno esterilizados e identificados; em seguida as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de Bacterioses da Universidade Federal Rural de Pernambuco para seu processamento.

Extração do DNA

Para extração do DNA foram utilizados 2mL de cada amostra; estas foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos e posteriormente o *pellet* foi ressuspendido em 100µL de Solução Salina Tamponada com Fosfato pH7,2 esterilizado. Utilizou-se o kit comercial DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN®) de acordo com as recomendações do fabricante.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA extraído foi submetido às ampliações em um volume final de 15µL contendo: 5µL de DNA genômico; 0,5µL dos *primers* específicos para IS900 a 20pMol (DF: 5'-GACGACTCGACCGCTAATTG-3' e o DR-1: 5'-

CCGTAACCGTCATTGTCCAG-3’); 2,75µL de água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega®) de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das reações foi realizado em um termociclador XP Thermal Cycler (Bioer Technology CO. LTD) com desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, em seguida 35 ciclos a 95°C por 1 minuto cada, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos (Taddei et al. 2008). O produto amplificado de 99pb correspondente ao DNA do MAP foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com *bluegreen* e visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados.

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

O DNA extraído foi submetido às amplificações em um volume final de 25,0µL contendo: 5µL de DNA genômico; 1µL dos *primers* específicos para IS900 a 10pMol (DF: 5’-GACGACTCGACCGCTAATTG-3’ e o DR-1: 5’-CCGTAACCGTCATTGTCCAG-3’); 5,5µL de Água mili-Q ultrapura e 12,5µL de QuantiFast SYBR Green PCR Kit (mistura para PCR - QIAGEN®) de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das reações foi realizado em termociclador “Rotor-Gene Q” (QIAGEN) com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos a 95°C por 20 segundos e 60°C por 30 segundos. Foi utilizado o software “Rotor-Gene Q Software v1.7” para acompanhamento e realização da interpretação dos resultados da qPCR.

O DNA de uma cepa padrão de MAP foi utilizado para a padronização da qPCR. A curva de desnaturação (*melting curve*) consistiu em 65°C por 90 segundos para a preparação, com posterior aumento gradual de 0,1°C a cada 2 segundos de 65 a 95°C. O pico da desnaturação foi em 82,9°C. O número de cópias foi determinado com metodologia adaptada de Rodríguez-Lázaro et al. (2005), com quantificação do DNA da cepa padrão utilizando-se o Qubit® 2.0 Fluorometer com kit comercial Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen™), o protocolo foi de acordo com as recomendações do fabricante. A cepa padrão de MAP foi então diluída na base 10 e posteriormente utilizado para construir a curva padrão da qPCR. A eficiência dos iniciadores foi 95,0% e o coeficiente de correlação linear (R2) foi 0,99953 (Figura 1). O valor do limiar de detecção (Threshold – Ct) ficou entre 9,59 e 30,17. O limite de detecção na curva

padrão foi de 22,3 cópias/mL. Por último, o número de cópias nas amostras de campo positivas foram quantificadas utilizando-se como referência a curva padrão obtida.

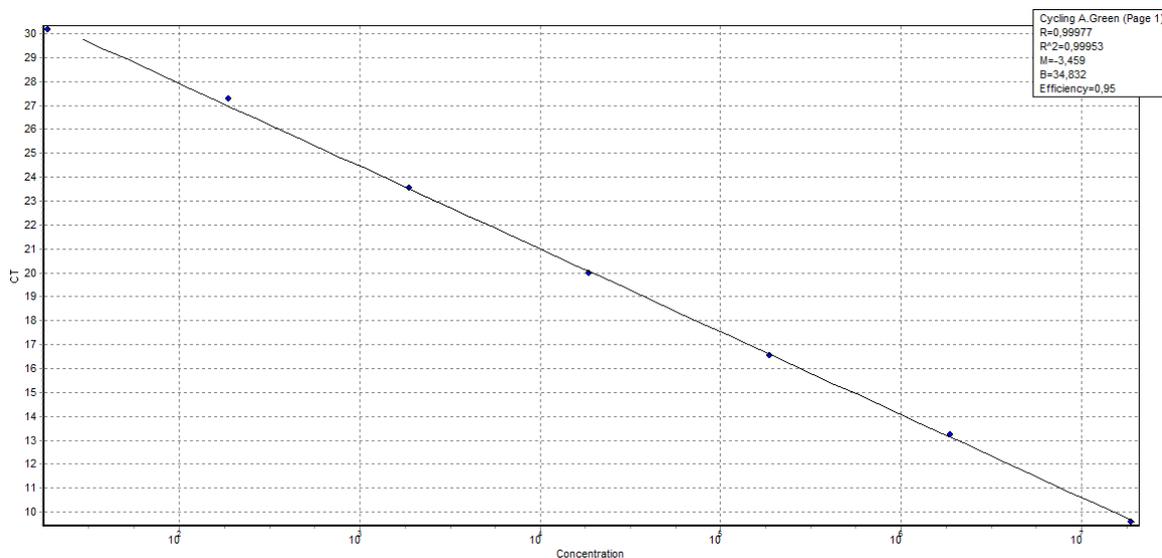


Figura 1 - Curva padrão em intervalos de diluição na base 10 para cálculo de eficiência e sensibilidade da qPCR para a região IS900 do MAP.

Sequenciamento das amostras e validação da PCR convencional

Para validação das amplificações, uma das amostras positivas na PCR convencional foi purificada utilizando o kit QIAquick® Gel Extraction (50), utilizando-se o protocolo do fornecedor. Posteriormente foi encaminhada para o sequenciamento. Os eletroferogramas obtidos foram analisados pelo programa PHRED para verificar a qualidade dos mesmos e, sequências com qualidade PHRED acima de 20 foram analisadas com a ferramenta Basic Local Align Sequence Tool - BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para confirmação do gene amplificado.

Comitê de Ética

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco aprovou os procedimentos éticos desta pesquisa com a licença N° 034/2013.

Análise Estatística

Para estudo da concordância entre os testes utilizou-se o coeficiente de Kappa (K), considerou-se a qPCR como *gold test*, e a interpretação convencional dos valores K adotadas foram: 0,00 - 0,20 = concordância fraca; 0,21 - 0,40 = regular; 0,41 - 0,60 = moderada; 0,61 - 0,80 = boa; 0,81- 1,00 = muito boa, valores negativos são

interpretados como equivalentes a 0,00 (Landis & Koch, 1977). Para o cálculo de concordância, sensibilidade e especificidade utilizou-se o programa computacional Bioestat versão 5.0. A associação entre os testes foi realizada pelo teste de qui-quadrado, com intervalo de confiança de 95%.

Resultados

Das 121 amostras de leite analisadas foi possível detectar a região IS900 do MAP em 20 (16,52%) amostras na PCR convencional e em 35 (28,92%) amostras na qPCR. O DNA do agente foi detectado em todas as propriedades estudadas (100,0%), variando de 10,00% a 23,81% na PCR convencional e de 10,00% a 36,84% na qPCR (tabela 1).

A quantidade de cópias do DNA do agente determinado pela qPCR em todas as amostras positivas de campo apresentaram uma média de 151,53 cópias/mL, com um mínimo de 13 cópias/mL e um máximo de 793 cópias/ml. A média das quantificações por propriedade das amostras positivas variou de 42,2 a 265,85 cópias do DNA/ml (tabela 1).

Tabela 1 - A frequência de amostras de leite positivas por propriedade utilizando a PCR convencional e a qPCR com a média de cópias/ml por propriedade determinado pela qPCR.

Propriedade	Quantidade de amostras	PCR Convencional	qPCR	Média da Quantificação de MAP/ml
1	22	3 (13,64%)	8 (36,36%)	262,62
2	19	3 (15,79%)	7 (36,84%)	42,2
3	21	5 (23,81%)	5 (23,81%)	91,72
4	19	3 (15,79%)	7 (36,84%)	265,85
5	20	4 (20,00%)	5 (25,00%)	60,74
6	20	2 (10,00%)	2 (10,00%)	66,3
Total	121	20 (16,52%)	34 (28,09%)	---

A concordância entre a PCR convencional e qPCR analisada pelo coeficiente de Kappa foi de 0,53, ou seja, moderada ($\chi^2 = 38,08$; $p < 0,000$). A sensibilidade e especificidade da PCR convencional foram de 50% e 96,6%, respectivamente.

O sequenciamento da amostra de campo apresentou uma homologia de 98% com o DNA do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP4, Genoma completo) depositado no NCBI.

Discussão

Este é o primeiro registro de detecção do MAP em amostras de leite no Estado de Pernambuco. A presença do MAP em leite já foi relatado no Brasil por Carvalho et al. (2009), que de 222 amostras de leite bovino cru, detectou-se o DNA para a região IS900 em 8 (3,6%) amostras, na região de Viçosa, Minas Gerais.

Em outros países, o MAP tem sido constantemente detectado em leite bovino como, por exemplo, na Suíça, que detectaram o DNA para a IS900 em 273 (19,7%) de 1384 amostras de tanques de leite (Corti e Stephan, 2002). Em outro estudo realizado no Chipre foram coletadas um total de 220 amostras de leite em tanques, dessas foram detectados 63 (28,6%) de amostras positivas usando a técnica de PCR em Tempo Real para a IS900 e F57 (Slana et al. 2009).

A paratuberculose é considerada como uma enfermidade exótica no território brasileiro, contudo, focos da doença já foram relatados em 11 Estados da Federação (Ristow et al. 2007; Yamasaki et al. 2013). Entre esses Estados, relatou-se no estado de Pernambuco a ocorrência da paratuberculose em um rebanho bovino de exploração leiteira pelo isolamento do MAP em amostras de fezes com confirmação genética pela PCR para a região IS900 (Mota et al. 2007).

A alta frequência de amostras de leite positivas encontradas neste estudo pode ser justificada pelo fato de as amostras de leite terem sido coletadas em propriedades foco de paratuberculose (Sá et al. 2013). Vale ressaltar que a frequência real dessa enfermidade no rebanho pode ser ainda mais elevada, visto que nem todos os animais que estão infectados eliminam o agente no leite (Corti e Stephan, 2002).

O método de extração de DNA utilizado nesta pesquisa foi muito eficiente, outras estudos também têm utilizado o mesmo kit comercial ou similar para realização da extração do MAP em amostras de leite com método de extração indicado pelo fabricante ou com modificações (Marchetti et al. 2013; Slana et al. 2008a).

Diante dos problemas causados pelo MAP e levando em consideração que esse micro-organismo tem levantado suspeitas de estar envolvido com a doença de Crohn em humanos, a pesquisa por testes rápidos e sensíveis para detecção desse agente no leite deve ser priorizada (O'Mahony e Hill, 2004). Neste estudo, o número de amostras de leite positivas na qPCR (34 amostras positivas) foi superior quando comparado com a PCR (20 amostras positivas). A qPCR oferece uma abordagem mais eficiente para a detecção de agentes patogênicos e comparada com a PCR convencional possui vantagens como o potencial para quantificação do agente, risco mínimo de contaminação cruzada, maior sensibilidade e a especificidade que pode ser reforçada pela utilização de sondas (Mackay, 2004).

Sonawane & Tripathi (2013) relataram que dois grupos de tecidos, multibacilar e paubacilar, foram utilizados para realização da PCR convencional para a região IS900 do MAP, obtiveram como resultado uma sensibilidade de 82,6% para o grupo multibacilar e de 13,3% para o grupo paubacilar. Para esses mesmos grupos, foi estabelecido e realizado uma qPCR que obtiveram uma sensibilidade de 100% na detecção do MAP para ambos os grupos.

Ao analisar a concordância entre a Nested PCR e qPCR para detecção do MAP, Fang et al. (2002) obtiveram um índice Kappa = 0,85. Esse valor mais elevado do que o encontrado nesta pesquisa pode ser justificado porque a Nested PCR possui uma maior sensibilidade quando comparado à PCR convencional, que foi utilizada nesta pesquisa (Moghadam et al. 2010).

O fato de três amostras terem sido positivas na PCR e não pela qPCR pode ser justificado pela quantidade de material genético do MAP, uma vez a mesma não se encontra homogênea nas amostras biológicas. Esse fato foi também relatado por Fang et al. (2002), que de 41 amostras analisadas, uma amostra foi positiva na Nested PCR e no cultivo, mas não na qPCR. Segundo esses autores uma distribuição não homogênea e/ou a pequena quantidade de bactérias de MAP na amostra podem ser responsáveis por esse efeito.

A detecção direta de MAP viável por métodos de cultura é considerada como o "teste ouro", no entanto, o MAP pode ser detectado de forma mais rápida e com cerca de dez vezes mais sensibilidade pelo método da qPCR (Slana et al. 2008a; Slana et al. 2009). Essa discrepância entre os métodos de isolamento e a qPCR pode ser explicado pela baixa concentração de MAP na amostra, pois a qPCR é uma técnica mais sensível de detecção do que o cultivo, tanto para amostras de fezes quanto para de leite (Pinedo et al. 2008).

Considerando que bovinos com a infecção subclínica podem eliminar quantidades baixíssimas de MAP no leite (Sweeney et al., 1992), faz-se necessário a utilização de testes de diagnósticos sensíveis o suficiente para a detecção desse agente. A sensibilidade das técnicas de qPCR para detecção do MAP em amostras de leite têm sido relatadas por detectar de 1 a 100 UFC por ml de leite (Slana et al., 2008b). A determinação da quantidade de bactérias do MAP em amostras de leite promove métodos úteis para a identificação da carga contaminante em produtos, algo possível pela qPCR. Já a PCR convencional não é quantitativa e meios de cultura também não conseguem avaliar esse fator por causa dos métodos de descontaminação das amostras que diminuem a quantidade de MAP nas mesmas (O'Mahony e Hill 2004).

Vale ressaltar que, leite cru de vaca tem sido foco de vigilância porque é reconhecido como um fator importante na transmissão do MAP de vaca para bezerro, resultados de um estudo demonstraram que o leite e o colostro podem ser fatores de risco para a infecção pelo MAP (Nielsen et al., 2008).

A avaliação genética de um microrganismo infeccioso é uma importante ferramenta na vigilância de enfermidades, pois é possível rastrear a origem e transmissão da doença, realizar a identificação de cepas virulentas, avaliação de tratamentos e ajuda ainda no aprimoramento de diagnósticos e vacinas (Kaur et al. 2010). Com o resultado do sequenciamento obtido neste estudo foi possível validar a técnica da PCR convencional utilizada, entretanto, não foi possível fazer uma identificação mais detalhada da cepa porque a sequência estudada foi pequena, 99pb, e a sequência de inserção IS900 é uma região bem conservada desse agente. Carvalho et al. (2012) após uma avaliação genética da sequência IS900 do MAP presente em amostras de leite brasileiro concluíram que a sequência IS900 é uma região muito bem conservada e que pode ser usada como ferramenta para a detecção molecular deste agente com fins epidemiológicos.

Ainda existe a suspeita de que o MAP possa estar envolvido com a doença de Crohn, e caso os seres humanos possam ser infectados pelo MAP, são vários os modos de transmissão possíveis, incluindo a transmissão entre humanos. No entanto, como os animais são a fonte de infecção principal do agente a transmissão a partir dos animais para os humanos seria a mais provável (Collins, 1997). A transmissão dos animais para os humanos pode ocorrer por alimentos, visto que o MAP viável tem sido recuperado em amostras de leite pasteurizado, tanto no Brasil quanto em outros países (Carvalho et al. 2012; Ellingson et al. 2005). E já foi também constatada a presença do MAP em subprodutos do leite como amostras de queijos provenientes da Grécia e da República Checa (Ikonomopoulos et al. 2005).

Conclusão

Com este trabalho, foi possível concluir que a região IS900 do MAP está presente no leite bovino da microrregião de Garanhuns, Pernambuco. Ainda foi possível concluir que a técnica da qPCR utilizada neste estudo demonstrou ser mais sensível do que a PCR convencional para detecção dessa bactéria em amostras de leite.

Referências

- Carvalho, I. A., Silva, V. O., Vidigal, P. M. P., Silva Junior, A., Moreira, M. A. S. 2012. Genetic evaluation of IS900 partial sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Brazilian isolates from bovine milk. *Tropical Animal Health and Production*, 44, 1331--1334.
- Carvalho, I.A., Silva Jr., A., V.E.B. Moreira, M.A.S. 2009. Short communication: Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by polymerase chain reaction in bovine milk in Brazil. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5408--5410.
- Carvalho, I.A., Pietralonga, P.A.G., Schwarz, D.G.G., Faria, A.C.S., Moreira M.A.S., 2012. *Short communication: Recovery of viable Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from retail pasteurized whole milk in Brazil. *Journal of Dairy Science*. 95(12), 6946--6948.

Collins, D.M., Gabric, D.M. De Lisle, G.W., 1989. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. FEMS Microbiology Letters, 60, 175--178.

Collins, M.T. (1997). *Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen? Journal of Dairy Science, 80, 3445--3448.

Collins, M.T., 1996. The veterinary clinics of North America, food animal practice, paratuberculosis (Johne's disease), ed. Sweeney RW, WB Saunders Co, Philadelphia, PA.

Corti S. and Stephan R., 2002. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. BMC Microbiology, 2, 1--7.

Ellingson, J.L.E., Anderson, J.L., Koziczkowski, J.J., Radcliff, R.P., Sloan, S.J., Allen, S.E., Sullivan, N.M., 2005. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. Journal of Food Protection, 68, 966--972.

Fang, Y., Wu, W.H., Pepper, J. L., Larsen, J. L., Marras, S.A.E., Nelson, E. A., Epperson, W. B., 2002. Comparison of Real-Time, Quantitative PCR with Molecular Beacons to Nested PCR and Culture Methods for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Bovine Fecal Samples. Journal Of Clinical Microbiology, 40(1), 287--291.

Green, E.P., Tizard, M.L.V., Moss, M.T., Thompson, J., Winterbourne, D.J., Mcfadden, J.J., Hermon-Taylor, J., 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucleic Acids Research, 17, 9063--9073.

Harris, N.B., Barletta, R.G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. Clinical Microbiology Reviews, 14(3), 489--512.

Ikonomopoulos, J., Pavlik, I., Bartos, M., Svastova, P., Ayele, W. Y., Roubal P., Lukas, J., Cook N., Gazouli M., 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. Applied and Environmental Microbiology, 71(12), 8934--8936.

- Kaur, P., Folia, G., Singh, S.V., Patil, P.K. and Sandhu, K.S. 2010. Molecular detection and typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from milk samples of dairy animals. *Tropical Animal Health and Production*, 42, 1031--1035.
- Kawaji, S., Taylor, D.L., Mori, Y., Whittington, R.J., 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Veterinary Microbiology*, 125, 36--48
- Landis, J.R. And Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1),159--174.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 190--212.
- Manning, E. J. B., Collins, M. T., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Épizooties*, 20, 133--150.
- Marchetti, G., Ricchi, M., Serraino, A., Giacometti, F., Bonfante, E., Arrigoni, N. 2013. Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and dairy cattle in Southern Italy: preliminary results. *Italian Journal of Food Safety*, 2, e35.
- Moghadam, M.T., Sarv, S., Moosakhani, F., Badiie, A., 2010. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Milk and fecal Samples in Dairy Cattle by PCR and Nested-PCR. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(24), 3055--3061.
- Mota R.A., Pinheiro-Junior J.W., Gomes M.J.P., Peixoto R.M., Maia C.L., Brito M.F., Chies J.A.B., Snel G.G.M., Bercht S., Juffo G.D., 2007. Paratuberculose em um rebanho leiteiro no Estado de Pernambuco, PE. *Arquivos do Instituto Biológico*, 74(2), 73--79.
- Nielsen, S.S., Bjerre, H., Toft, N., 2008. Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 91, 4610--4615. 81 3423--1949
- O'Mahony, J., Hill, C., 2004. Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4561--4568.

- Pinedo, P.J., Rae, D.O., Williams, J.E., Donovan, G.A., Melendez, P., Buergelt, C.D., 2008. Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *Transboundary and Emerging Diseases*, 55, 125--133
- Ristow, P., Marassi, C.D., Rodrigues, A.B.F., Oelemann, W.M., Rocha, F., Santos, A.S.O., Carvalho, E.C.Q., Carvalho, C.B., Ferreira, R., Fonseca, L.S., Lilenbaum, W. 2007. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. *The Veterinary Journal*, 174(2), 432--434.
- Rodríguez-Lázaro, D., D'Agostino, M., Herrewegh, A., Pla, M., Cook, N., Ikononopoulos, J. 2005. Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 93--104.
- Sá, L.M., Oliveira, J.M.B., Santos, G.R., Brandespim, D.F., Da Silva Júnior, J.L., Mota, R.A., Pinheiro Júnior, J.W., 2013. Avaliação sorológica e de fatores de risco para a infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em rebanhos leiteiros da Microrregião de Garanhuns, Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(3), 310--314.
- Slana, F., Paolicchi, B., Janstova, P., Navratilova, I., Pavlik., 2008b. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinarni Medicina*, 53, 283--306.
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Pavlik, I., 2008a. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by *IS900* and *F57* competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 250—0257.
- Slana, I., Liapi, M., Moravkova, M., Kralova, A., Pavlika, I., 2009. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow bulk tank milk in Cyprus detected by culture and quantitative *IS900* and *F57* real-time PCR. *Preventive Veterinary Medicine*, 89, 223--226.
- Sonawane, G.G., Tripathi, B.N., 2013. Comparison of a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) with conventional PCR, bacterial culture and ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in sheep showing pathology of Johne's disease. *SpringerPlus*, 2:45.

Sweeney R.W., Whitlock R.H., Rosenberger A.E., 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 166--171.

Taddei, R., Barbieri, I., Pacciarini, M.L., Fallacara, F., Belletti, G.L., Arrigoni, N. 2008. *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: Implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture. *Veterinary Microbiology*, 130, 338--347.

Vansnick, E., Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L., Portaels, F., 2004. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, 100: 197-204

Yamasaki E.M., Tokarnia C.H., Galvão A., Gomes M.J.P., Chies J.A.B., Veit T.D., Aragão A.P., Brito M.F., 2010. Aspectos clínicos patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(11), 921--932.

6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho, foi possível concluir que a região IS900 do MAP está presente no leite bovino da microrregião de Garanhuns, Pernambuco. Ainda foi possível concluir que a técnica da qPCR utilizada neste estudo demonstrou ser mais sensível do que a PCR convencional para detecção dessa bactéria em amostras de leite.

APÊNDICE 1

Tabela 2: Respektivas amostras positivas na qPCR e na PCR convencional para a região IS900 com os dados da quantificação da qPCR.

Amostra	qPCR	PCR Convencional	Quantificação da qPCR em cópias do MAP por mL
4	+	-	1,14*10 ²
10	+	-	2,08*10 ²
15	+	-	3,39*10 ²
16	+	+	2,36*10 ²
17	+	-	2,54*10 ²
18	+	+	4,32*10 ¹
20	+	+	1,65*10 ²
22	+	-	3,53*10 ²
27	+	+	6,99*10 ¹
28	+	-	2,73*10 ¹
35	+	-	4,21*10 ¹
37	+	+	5,38*10 ¹
40	+	-	4,19*10 ¹
42	+	-	4,02*10 ¹
43	+	+	2,02*10 ¹
44	+	+	2,61*10 ²
45	+	+	6,32*10 ¹
46	+	+	4,15*10 ¹
47	+	-	7,99*10 ¹
52	-	+	-
59	+	+	1,30*10 ¹
66	+	+	3,61*10 ¹
68	+	+	5,29*10 ¹
69	+	-	2,18*10 ²
70	+	-	3,00*10 ²
72	+	+	1,10*10 ²
75	+	-	3,51*10 ²
80	+	-	7,93*10 ²
102	+	+	1,39*10 ¹
103	+	+	2,25*10 ¹
107	+	-	7,05*10 ¹
115	+	+	7,28*10 ¹
112	-	+	-
116	+	-	1,24*10 ²
121	+	+	1,36*10 ¹
128	-	+	-
133	+	-	1,19*10 ²

ANEXO 1

Comitê de Ética

FORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA
USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO
LICENÇA Nº: 034/2013
PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS
USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO
PROTOCOLO Nº 23082.021083/2012
RECEBIDO EM: 29/04/2013 F01

No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

Lista das DCBs disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista_dcb_2007.pdf

1. FINALIDADE

Ensino	<input type="checkbox"/>
Pesquisa	<input checked="" type="checkbox"/>
Treinamento	<input type="checkbox"/>

Início: 01/12/2012

Término: 30/11/2014

2. TÍTULO DO PROJETO/AULA PRÁTICA/TREINAMENTO

Deteção de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) em amostras de leite de bovinos na Microrregião Garanhuns, PE

Área do conhecimento: Medicina Veterinária

Lista das áreas do conhecimento disponível em:

<http://www.cnpq.br/areasconhecimento/index.htm>

3. RESPONSÁVEL

Nome completo	José Wilton Pinheiro Júnior
Instituição	Universidade Federal Rural de Pernambuco
Unidade	Acadêmica de Garanhuns

CEUA - UFRPE
Aprovado em
01/04/2013
Validade
01/04/2015

14. TERMO DE RESPONSABILIDADE

(LEIA CUIDADOSAMENTE ANTES DE ASSINAR)

Eu, José Wilton Pinheiro Júnior, Médico Veterinário, CRMV 3247-PE, certifico que:

- a) li o disposto na Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;
- b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Assinatura: _____

Data: 28/10/2013

Encaminhar em 2 vias.

A critério da CEUA, poderá ser solicitado o projeto, respeitando confidencialidade e conflito de interesses.

Quando cabível, anexar o termo de consentimento livre e esclarecido do proprietário ou responsável pelo animal.

16. RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

A Comissão de Ética no uso de animais, na sua reunião de 01/10/2013, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura: _____

Coordenador da Comissão



Carla Antônia Alves Pontes
Presidente
CEUA - UFRRPE

A Comissão de Ética No Uso de Animais, na sua reunião de ____/____/____, emitiu o parecer em anexo e retorna o Protocolo para sua revisão.

Assinatura: _____

Coordenador da Comissão

 CEUA - UFRRPE
Aprovado em
01/04/2013
Validade
01/04/2015